

Renaturierung von rekombinantem Mistellektin I aus Inclusion Bodies

**Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte
Dissertation**

**von Heike Baars-Hibbe
aus Braunschweig**

1. Referentin:

PD Dr. Ursula Rinas

2. Referent:

PD Dr. Udo Rau

eingereicht am:

20.06.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am:

18.09.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Baars-Hibbe, H. and Rinas, U.; Kinetic studies on the renaturation of heterodimeric mistletoe lectin from bacterial inclusion bodies. 17. Faltertage; Leucorea in Wittenberg, 8-10. April, Wittenberg, F.R.G. (Poster 2); 2005

Baars-Hibbe, H., Müller, C., Vallejo, L.-F. and Rinas, U.; Kinetic studies on the renaturation of dimeric disulfide-bonded proteins. 17. Faltertage; Leucorea in Wittenberg, 8-10. April, Wittenberg, F.R.G. (Vortrag); 2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (heutige Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) in Braunschweig unter der Leitung von Frau PD Dr. U. Rinas angefertigt, der ich für die Betreuung und Unterstützung in den letzten Jahren herzlichst danke.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. U. Rau für die Übernahme des Referates und bei Herrn Prof. Dr. R. Mendel für die Bereitschaft den Vorsitz zu übernehmen.

Für das gebotene Thema und die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Ziehr bedanken und meinen Dank an alle Kollegen der ehemaligen BVT des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung für die Zusammenarbeit und das familiäre Arbeitsklima richten. Besonders zu erwähnen wäre dabei Herr Dr. V. Hecht, der viel Energie in die mathematischen Algorithmen der Modellierung gesteckt hat. Frau C. Mollenschott, die mir bei den anfänglichen Analytikproblemen mit Rat und Tat zur Seite stand, möchte ich ebenfalls danken.

Herrn Dr. M. Nimtz möchte ich für die Hilfe bei der MALDI-TOF-Auswertung danken.

Einen Dank auch an die ehemalige Viscum AG für die Kooperation.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen insbesondere Frau X. Lu und Herrn Dr. L.F. Vallejo, aber auch Herrn Dr. E. Betiku und Frau N. Konisch bin ich für das freundschaftliche Verhältnis verbunden.

Ein besonderer Dank gilt meinem Bruder Dr. L. Baars-Hibbe für die kritische Durchsicht der Arbeit und für die immer zur Verfügung stehende Hilfe.

Auch möchte ich mich bei meinen Eltern für die Liebe und Unterstützung in jeder Hinsicht bedanken.

Außerdem und nicht zu vergessen sind meine Freunde, die mich immer wieder motiviert haben und mir zur Seite standen. Frau S. Teisner möchte ich für die Hilfe beim Kampf mit der neuen Rechtschreibung danken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Zielsetzung	3
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1 Mistel (<i>Viscum album</i>)	4
2.2 Mistellektin I	5
2.2.1 Natürliches Mistellektin I (ML I)	5
2.2.1.1 Struktur des natürlichen Mistellektins	5
2.2.1.2 Funktionsweise des natürlichen ML I	8
2.2.1.3 Natürliche Wirkung und klinischer Einsatz	10
2.2.2 Rekombinantes Mistellektin I (rML I)	12
2.2.2.1 Struktur des rekombinanten Mistellektin I	12
2.2.2.2 Klinische Wirkung	13
2.3 Renaturierung von rekombinanten Proteinen	14
2.3.1 Rekombinante Proteine	14
2.3.2 Proteinfaltung	16
3. Material und Methoden	26
3.1 Produktion von rML A und rML B	26
3.1.1 Mikroorganismen und Vektorsystem	26
3.1.2 Transformation des rMLB C21S-C194S-Stammes (mrMLB)	26
3.1.2.1 Kompetente Zellen: <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	27
3.1.2.2 Elektrotransformation (Elektroporation)	27
3.1.3 Stammhaltung	28
3.1.4 Kultivierung	28
3.1.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben	29
3.1.4.2 Kultivierung im Bioreaktor	30
3.1.4.3 Glukose-Bestimmung	30
3.1.4.4 Bestimmung der Biotrockenmasse	31

3.2 Aufarbeitung von rMLA und rMLB	31
3.2.1 Zellaufschluss durch Ultraschall	31
3.2.2 Isolierung der Inclusion Bodies	32
3.2.3 Proteinausfällung (TCA-Fällung)	33
3.3 Analytik	33
3.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese	33
3.3.1.1 Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese	34
3.3.1.2 Gradienten-SDS-PAGE	35
3.3.1.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE	35
3.3.2 Proteinfärbemethoden	37
3.3.2.1 Coomassie®-Färbung	37
3.3.2.2 Colloidale Coomassie®-Färbung	38
3.3.2.3 Silberfärbung	38
3.3.3 Western Blot	39
3.3.3.1 Semidry-Blot	40
3.3.3.2 Immunfärbung	41
3.3.4 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay und Enzyme-Linked-Lectin-Assay	42
3.3.4.1 Austausch des Puffersystems	42
3.3.4.2 ELISA	43
3.3.4.3 ELLA	46
3.3.5 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay	48
3.3.6 Massenspektrometrie	50
3.4 Rückfaltung	52
3.4.1 Solubilisierung	52
3.4.2 Rückfaltungssysteme	53
3.4.3 Aufnahme der Rückfaltungskinetik	56
4. Ergebnisse und Diskussion	57
4.1 Produktion von rMLA und rMLB	57
4.1.1 Kultivierung im Schüttelkolben	57
4.1.2 Kultivierung im Bioreaktor	59
4.2 Aufarbeitung von rMLA und rMLB	61
4.2.1 Inclusion Bodies-Aufreinigung	61

4.2.2 Problemstellung bei der rML-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA/ELLA	62
4.3 Optimierung der Rückfaltung	63
4.3.1 Rückfaltungsmethoden	64
4.3.2 Löslichkeit der Proteine	65
4.3.2.1 Löslichkeit der Monomere	65
4.3.2.2 Löslichkeit der Proteine im Rückfaltungsansatz	69
4.3.3 Bildung eines Homodimers (rMLAA)	72
4.3.4 Variation der Proteinzugabe	74
4.3.5 Temperaturoptimierung	79
4.3.6 Optimierung des Redoxsystems	81
4.3.7 pH-Wert-Optimierung	82
4.3.8 Optimierung durch Mutation?	84
4.4 Rückfaltungskinetik und Modellierung	88
5. Zusammenfassung und Ausblick	103
6. Literaturverzeichnis	107
7. Anhang	118
7.1 Materialien- und Geräteangaben	118
7.2 Sequenz von IbpA	128
7.3 Modellanpassungen zu Kapitel 4.4	131

Abkürzungsverzeichnis

A	reduziertes reaktionsfähiges rMLA, direkt nach Zugabe in den Rückfaltungspuffer
A _l	lösliches rMLA
A _x	lösliches reaktionsunfähiges rMLA
A _u	unlösliches rMLA
AB	rML
Ag	Silber
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
a.P.	ausgefallene Proteine
Asp	Asparagin
B	reduziertes rMLB direkt nach Zugabe in den Rückfaltungspuffer
B _l	lösliches rMLB
B _x	lösliches reaktionsunfähiges rMLB
B _u	unlösliches rMLB
B _i	reaktionsfähiges Intermediat von rMLB
BCA	Bicinchonininsäure
BMP-2	bone morphogenetic protein-2
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C/C	Cystein/Cystin
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ch.-Bez.	Chargen-Bezeichnung
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethan-sulfonsäure
CO ₂	Kohlendioxid
CTA	Cellulose Triacetat
Cu	Kupfer
Cys	Cystein
DE 3	Stamm (<i>E. coli</i> BL21) enthält das λDE3-Lysogen, welches das Gen für die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promoters trägt.
d.M.	definiertes Medium
DnaK	Chaperon der Hsp70-Klasse
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
ELLA	Enzym-Linked-Lectin-Assay
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatische Retikulum
F	Farad
fM	femtomolar
GAGA	Nukleosidabfolge von Guanosin und Adenosin
Glu	Glutaminsäure
GroEL	Chaperon der Hsp60-Klasse
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
hFGF	human basic fibroblast growth factor
HLA-DR	human leucocyte antigen
HSP	Hitzeschockprotein
I	Intermediat
IB	Inclusion Bodies
Ibp	Inclusion Bodies Protein
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die benötigt wird, um ein Enzym <i>in vitro</i> zu 50% zu blockieren
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN γ	γ -Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
K	Gleichgewichtskonstante
k_x	Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion x
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
I.P.	lösliche Proteine
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI	matrix-assisted-laser-desorption-ionization
mM	millimolar
ML	Mistellektin
MLA	Mistellektin A-Kette
MLB	Mistellektin B-Kette

mrMLB	mutierte rekombinante Mistellektin B-Kette, rMLB C21S-C194S
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MWCO	Molekulargewicht cut-off in Daltons
m/z	Masse/Ladung
n	Anzahl
N	natives Protein
NCBI-BLAST	National Centre for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool
Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc	6'-Sialyl-N-acetyllactosamin
nM	nanomolar
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD _x	Optische Dichte bei λ_x
ox	oxidiert
p.A.	Für Analytik
PBS	Natriumphosphatpuffer
PDGF	humaner Wachstumsfaktor aus Blutplättchen
PES	Polyethersulfon
pH	Maß für die Säurestärke einer Lösung
pI	Isoelektrischer Punkt
pM	pikomolar
POD	Peroxidase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	Teile pro Million
pT7	Promotor T7
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r	Reaktion
R	Reaktionsgeschwindigkeit
<i>R</i>	Gaskonstante
RC	regenerierte Cellulose
red	reduziert
RIP II	Ribosomen-inaktivierendes Protein Typ II
rML	rekombinantes Mistellektin
rMLA	rekombinante Mistellektin A-Kette
rMLB	rekombinante Mistellektin B-Kette
rMLAA	rekombinantes Homodimer der A-Kette
rpm	Umdrehung pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Siemens

<i>S</i>	S-Wert, Sedimentationsgeschwindigkeit in einer Ultrazentrifuge von Ribosomenbestandteilen
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese
—SH	Thiol
sHsp	kleines Hitzeschockprotein
<i>T</i>	absolute Temperatur
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
T _H -Zellen	Helfer-T-Zellen
TMB	TMB-One-Ready-to-Use-Substrat
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TOF	time of flight
TP	Totalprotein
t-PA	tissue plasminogen activator (Alteplase)
U	ungefaltetes Protein
VAA I	Viscum-album-Agglutinin I
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western Blot
w/v	Gewicht/Volumen
α	α -Helix
β	β -Faltblatt
ΔG	freie Energieänderung
ΔH	Enthalpieänderung
ΔS	Entropieänderung
λ	Wellenlänge
μ	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1 Einführung

Das Angebot vieler Proteine, die potentielle Verwendung im klinischen und industriellen Bereich haben, ist oft durch ihre niedrige natürliche Verfügbarkeit begrenzt [Misawa und Kumagai 1999]. Genrekombinante Pharmazeutika bekommen stetig eine zunehmende Bedeutung in der Medizin. Sie sollen zur Heilung von Krankheiten dienen, die heute noch nicht behandelbar sind [Schmidt 2004].

Das Wachstum von Biopharmazeutika im Arzneimittelmarkt nimmt durchschnittlich um 18 % jährlich zu. Chemisch-synthetische Medikamente wachsen nur halb so stark. In Deutschland wurden bis Februar 2006 115 Medikamente auf der Basis von 84 rekombinanten Wirkstoffen zugelassen. International werden mit genetischen Arzneimitteln rund 32 Milliarden US-Dollar (7 % des Arzneimittelumsatzes) erzielt. Im deutschen Apothekenmarkt beträgt der Umsatz 2,06 Milliarden Euro (9,9 %, Stand 2005). Jedes Jahr kommt ein halber Prozentpunkt hinzu. 2010 werden vermutlich weltweit mehr Biopharmazeutika neu zugelassen als konventionelle Arzneimittel. Die wichtigsten Biopharmazeutika sind Insulinpräparate (gegen Diabetes), das Hormon EPO und Varianten davon (gegen Blutarmut), Immunmodulatoren wie z.B. Interferone und TNF- α -Blocker, welche bei Hepatitis B und C, rheumatologischen Erkrankungen und Multipler Sklerose eingesetzt werden. Außerdem werden monoklonale Antikörper (gegen Krebserkrankungen), Enzyme und Gerinnungsfaktoren (Stoffwechsel- und Gerinnungsstörungen) hergestellt [Mansel 2006, VFA 2006].

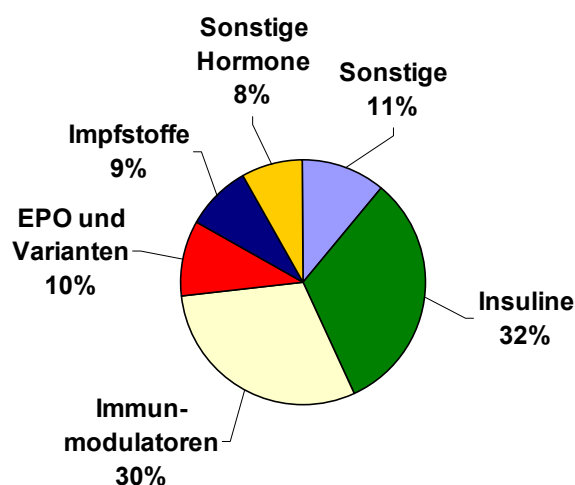


Abbildung 1.1: Umsatzverteilung bei gentechnischen Arzneimitteln im deutschen Apothekenmarkt 2005 [VFA 2006]

Schon seit Jahrtausenden ist die Europäische Mistel (*Viscum album* L.) bekannt für ihre therapeutische Wirkungsweise [Franz 1981]. Die Einführung der Mistel in die Krebstherapie geht auf Rudolf Steiner und Ita Wegmann zurück. 1920 wendete Steiner erstmals speziell zubereitete, wässrige Mistelextrakte erfolgreich bei Krebspatienten an [Mengs et al. 2002, Li 2002]. Diese Antikrebsmittel gelten als Hauptpfeiler der anthroposophischen Medizin. Diverse Mistelpräparate, die sich durch Herstellungsverfahren und Dosierung unterscheiden, sind heute im Handel [Hauser 1993].

Die am meisten biologisch aktiven Bestandteile der Mistel sind die Mistellektine ML I, ML II und ML III [Mengs et al. 1997]. Nachdem die immunaktive Wirkung von ML I (VAA I) nachgewiesen werden konnte, konzentrierte sich die Mistelextraktanwendung in der Onkologie zunehmend auf Präparate mit definierten Gehalt an ML I [Beuth et al. 1994]. Es hat eine Antitumor- und Antimetastasenaktivität und besteht aus einer katalytisch aktiven A-Kette (Ribosomen-inaktivierendes Enzym Typ II) und einer Kohlehydrat-bindenden B-Kette (Lektin) [Mengs et al. 1997, Eck et al. 1999a].

Eine Therapie sollte mit einer genau festgelegten Dosis erfolgen. Pflanzliche Arzneimittel verschiedener Hersteller unterscheiden sich aber oft in Gehalt, Zusammensetzung und Präparationsmethode deutlich voneinander. Ein definiert zusammengesetztes Arzneimittel ist den pflanzlichen Zubereitungen daher grundsätzlich vorzuziehen, vor allem wenn der Wirkstoff nur eine geringe therapeutische Breite besitzt (Normierungsverfahren erforderlich). Pharmazeutische Präparate mit dem Wirkstoff ML I sind in der Krebstherapie vielseitig einsetzbar. Aufgrund dessen ist es von Bedeutung, Medikamente gleicher Zusammensetzung zu entwickeln. Da die Erzeugung durch natürliches Mistellektin nicht einheitlich durchgeführt werden kann (erntezeit- und wirtsbaumspezifisch), ist eine synthetische oder biotechnologische Herstellung von Vorteil, um in großen Mengen günstig Wirkstoff gleicher Qualität zu fertigen [Gloger 2002].

Die Aufklärung der Gensequenz des Mistellektins I in *Viscum album* ermöglicht die gentechnische Herstellung des rekombinanten Mistellektins (rML I, rViscumin, Aviscumin) in *Escherichia coli* [Eck et al. 1999a].

E. coli sind die am meisten verwendeten Organismen für die Produktion von rekombinanten Proteinen, wobei diese häufig als unlösliche inaktive Proteinaggregate, sogenannte Inclusion Bodies, in der Zelle vorliegen. Mittels sorgfältig entwickelter Solubilisierungs-, Rückfaltungs- und Reinigungsmethoden lassen sich für viele dieser Proteine die aktiven biologischen Formen erhalten [Vallejo and Rinas 2004a, Singh and Panda 2005].

Sind die Inclusion Bodies durch reduzierende Agenzien und hohe Konzentrationen von Denaturierungsmitteln gelöst worden, kann die Renaturierung durch Entfernung dieser Agenzien mittels Verdünnung oder einem Pufferaustauschschritt wie Dialyse, Diafiltration, Gelfiltrationschromatographie oder Immobilisierung auf festen Trägermaterial durchgeführt werden. Wegen ihrer einfachen Handhabung ist die Verdünnung der solubilisierten Proteine direkt in den Rückfaltungspuffer die am häufigsten verwendete Methode in kleinem Maßstab [De Bernardez Clark 2001]. Dabei konkurriert die korrekte Faltung mit Missfaltungen und Aggregation [Vallejo and Rinas 2004a]. Das Gleichgewicht dieser Reaktionen kann durch verschiedene Reagenzien (Detergenzien, chaotrope Agenzien usw.) und unter unterschiedlichen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Redoxsystem usw.) auf die Seite der Renaturierung hin verschoben werden. Die Renaturierung (Rückfaltung) beinhaltet die Faltung der Sekundärstruktur bis hin zur Quartärstruktur einschließlich der Ausbildung von kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen in die native, biologisch aktive Struktur.

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung des schon vorhandenen biotechnologischen Verfahrens der Viscum AG (Deutschland) zur Rückfaltung rekombinanten Mistellektins I (rViscumin). Durch Variation der renaturierungs- und löslichkeitsbeeinflussenden Reaktionsbedingungen wie z.B. Redoxsystem, pH-Wert, Temperatur und Proteinzugabeart usw. sollte die Ausbeute mittels des „Prinzips der Verdünnung“ erhöht werden. Das Anliegen der Kooperation war eine wirtschaftlichere Produktionsweise des Proteins, welches sich in der klinischen Studie Phase I befindet.

Zudem sollte diese Arbeit ein Verständnis über den Ablauf der komplexen Faltungsmechanismen schaffen. Mit Hilfe der Aufnahme von Kinetiken in Abhängigkeit der Proteinkonzentration sollte eine Erkenntnis über den Faltungsprozess ermittelt werden, um ein Modell erstellen zu können. Mit der Formulierung eines solchen Modells wäre eine weitere Optimierung möglich.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Mistel (*Viscum album*)

Die Mistel ist ein bis zu 1 m großer, kugeliger, immergrüner, halbschmarotzender Halbstrauch mit erbsengroßen, weißlichen Scheinbeeren, der auf unterschiedlichen Bäumen in Europa, aber auch in Afrika und Asien anzutreffen ist. Sie bevorzugt Pappeln, Apfelbäume und Tannen. Ihr Wurzelsystem entzieht der Wirtspflanze Wasser und Nährstoffe, wobei sie die pflanzliche Photosynthese aber selbstständig durchführt.



Abbildung 2.1: *Viscum album* Loranthaceae

Die europäische Mistel (*Viscum album* Loranthaceae) wird schon seit Jahrtausenden als Heilmittel eingesetzt [Franz et al. 1981].

Für die Druiden war sie die heiligste Pflanze („die alles Heilende“); in jedem Heiltrank wurde sie für alle erdenklichen gesundheitlichen Bedürfnisse verwendet [Gaius Plinius Secundus der Ältere 23-79 n. Chr.]. Ihre Inhaltsstoffe werden schon seit 400 v. Chr. (Hippokrates) therapeutisch eingesetzt. Sie werden in der Phytotherapie (z.B. Sterilität, Epilepsie und Vergiftungen, Segmenttherapie bei Gelenkerkrankungen und Palliativtherapie) und in der Homöopathie (Blutdruck- und Herzleiden, Schwindel sowie Verschleißkrankheiten) angewendet. Die Wirkung ist immunstimulierend und unterstützend bei Tumorbeschwerden (Linderung der Nebenwirkungen der tumordestruktiven Therapiemethoden) und bei der Krebstherapie [Auster und Schäfer 1960, Büssing 1997, Ebster und

Jarisch 1929, Ebster 1929, Ernst 2001, Gaultier and Chevalier 1907, Nolle 1930, Olsnes et al. 1982]. Mistelextrakte sind nicht bei allen Krebsarten anwendbar (z.B. nicht bei Krebsarten des blutbildenden Systems) [Gabius und Gabius 2004] und sollten nicht als alleinige Therapie von Tumoren verwendet werden [Fritz et al. 2001]. Die meisten vergleichenden und nicht-vergleichenden Studien zeigen positive Ergebnisse der Misteltherapie [Kienle und Kiene 2004].

Die immunologischen und zytotoxischen Effekte der Mistel werden hauptsächlich den Apoptose-induzierenden Glykoproteinen (Mistellektine) und zu einem geringeren Umfang den nekrotischen Zelltod herbeiführenden Polypeptiden (Viscotoxine) zugeschrieben [Büssing et al. 1996, 1999, Jannsen et al. 1993, Kienle und Kiene 2004, Mengs et al. 2002, Ribéreau-Gyon et al. 1989].

Ein Hauptwirkstoff der Mistel ist das Mistellektin I. In der Mistel befinden sich vier verschiedene Lektine (Mistellektin I, II, III und ein Chitin-bindendes Mistellektin VisalbcBA), die sich in Molekulargewicht, Grad der Glykosylierung und Zuckerspezifität unterscheiden (wird bei der Isolierung und Trennung durch Affinitätschromatographie ausgenutzt [Jordan und Wagner 1986]). Sie stellen die pharmazeutisch wirksamen Inhaltsstoffe der Pflanzenextrakte dar [Franz et al. 1981, Lyu et al. 2000, Mengs et al. 2002].

2.2 Mistellektin I

2.2.1 Natürliches Mistellektin I (ML I)

2.2.1.1 Struktur des natürlichen Mistellektins

Lektine sind Proteine oder Glykoproteine mit spezifischen Bindungsseiten für Zucker. Allgemein bewirken Lektine Adhäsionen von Zellen, von Mikroorganismen an Zellen sowie von Glykokonjugaten an Zellen [Franz 1986, 1990, Goldstein et al. 1980, Kocourek and Hořejší 1981, Rüdiger 1978].

Mistellektin I (ML I) gehört zu den Gruppe II Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, welche ihre Liganden in flach vorgebildeten Taschen an der Proteinoberfläche binden [Mikeska et al. 2005, Rini 1995]. Es ist identisch mit *Viscum album*-Agglutinin I (VAA I), Viscumin und Anti-BVA und hat 25 Isolektine. In Lösung liegt ML I als konzentrationsabhängiges Gemisch aus Dimeren (ca. 60 kDa) und nicht-kovalent verbundenen Tetrameren (ca. 115 kDa) vor. Die Dimere bestehen aus einer katalytisch aktiven MLA-Kette (ca.

29 kDa) und einer lektinähnlichen MLB-Kette (ca. 34 kDa), die durch eine Disulfidbindung (Cys 260A und Cys 5B) und viele nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind.

ML I gehört zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen des Typs II (RIP II) [Franz et al. 1981, Krauspenhaar et al. 1999, Luther et al. 1980, Mengs et al. 2002, Niwa et al. 2003, Olsnes et al. 1982, Schink et al. 1992, Soler et al. 1996]. Es besitzt einen Kohlenhydratanteil von etwa 11 % mit unterschiedlicher Affinität zu D-Galaktose- und/oder N-Acetylgalactosamin-Resten [Franz 1986, Lee et al. 1992, Luther et al. 1980].

Die ML I-quartäre Struktur existiert als Tetramer [ML I]₂ mit innerer kristallographischer, zweigeteilter Symmetrie. Die Kristalle sind hexagonal mit 24 Molekülen pro Zelleinheit [Sweeney et al. 1993, 1998].

Insgesamt enthält ML I zehn Cysteinreste, wobei ein Cystein in der MLA-Kette und neun in der MLB-Kette vorliegen. In der MLB-Kette sind drei intramolekulare Disulfidbindungen vorhanden [Eck et al. 1999a]. Vier N-Glykosylierungsseiten sind in der Aminosäuresequenz von ML I ermittelt worden (eine in der MLA-Kette und drei in der MLB-Kette) [Soler et al. 1996, 1998].

Die MLA-Kette ist ein globuläres Enzym mit einer umfangreichen Sekundärstruktur, die aus drei Domänen (zwei α - und eine β -Domäne) besteht. Die MLB-Kette stellt das Sialinsäure- und D-Galaktose-spezifische Lektin dar, welches sich in zwei homologe β -Domänen faltet. Diese haben viele zuckerbindende Seiten, die spezifische Glykostrukturen auf der Zielzelloberfläche erkennen und mit ihnen wechselwirken [Franz et al. 1981, Krauspenhaar et al. 1999, Müthing et al. 2005]. Die MLB-Kette bildet eine doppelt dreiblättrige Struktur („ β -trefoil“) aus, in welcher die β -Faltblätter der Subdomänen sich selbst um eine pseudo-dreigefaltete Achse anordnen [Mikeska et al. 2005, Sweeney et al. 1998].

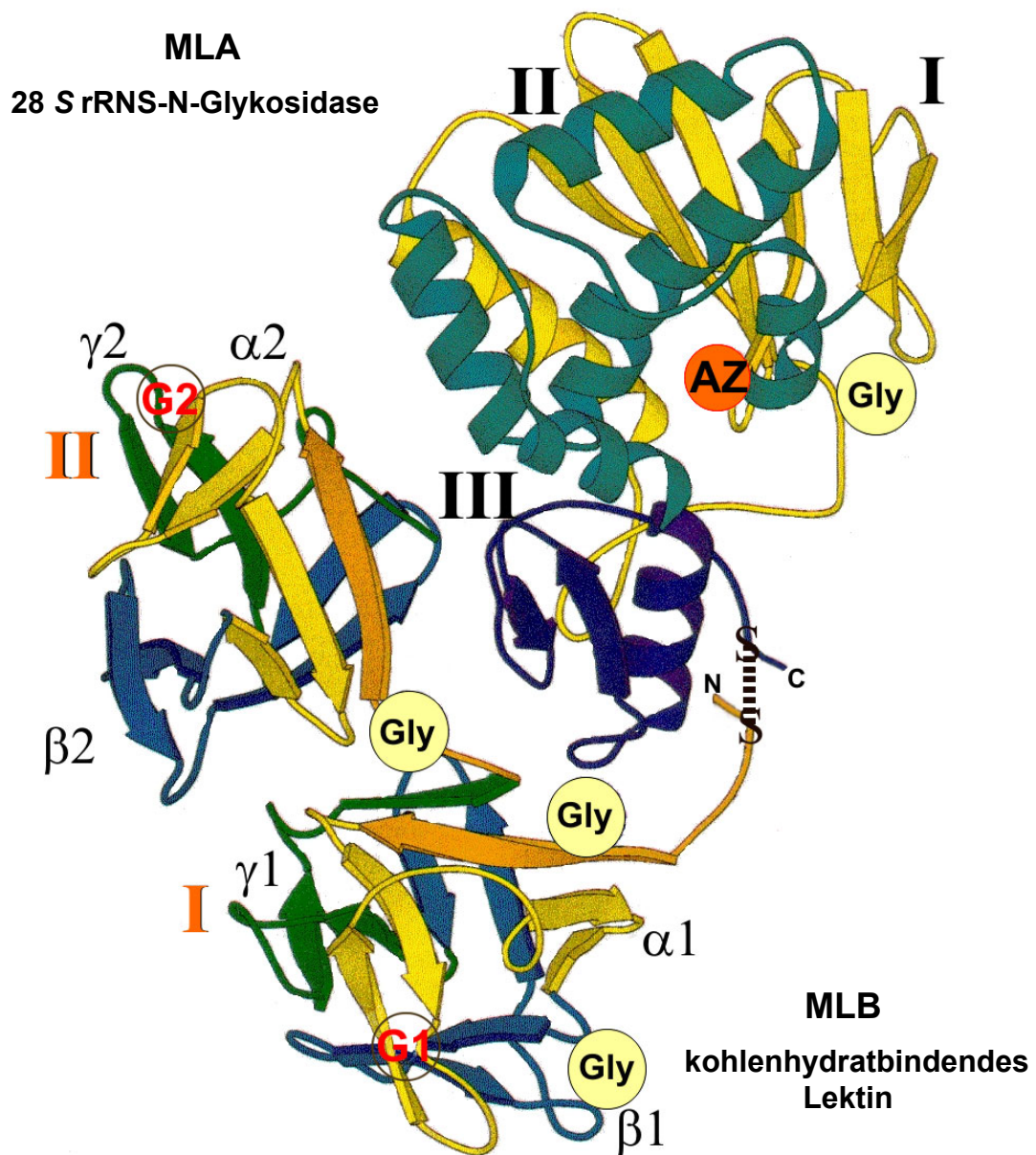


Abbildung 2.2 : Struktur des natürlichen Mistellektins

MLA-Kette: drei Domänen I, II und III (schwarz); AZ: aktives Zentrum; MLB-Kette: zwei homologe Domänen I und II (orange) mit drei Unterdomänen α , β und γ ; beide Ketten sind durch eine Disulfidbindung verbunden; Gly: Glykosylierungsstelle; G1 (niedrige Affinität) und G2 (hohe Affinität): Kohlenhydratbindungsstellen; C: Carbonsäure-Ende, N: Amino-Ende [abgewandelte Struktur aus Krauspenhaar et al. 1999]

Nach neueren Erkenntnissen bindet die MLB-Kette bevorzugt an α 2-6-sialylierte Polysaccharide bzw. Neolacto-Serie Ganglioside und Sialoglykoproteine mit Typ II Glukanen, welche einen Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-Terminus enthalten, und weniger an Galaktose [Müthing et al. 2004].

2.2.1.2 Funktionsweise des natürlichen ML I

Die Funktionsweise des ML I ist in Abbildung 2.3 (S. 9) dargestellt. Nachdem die MLB-Kette an die Glykoproteine und -lipide der Zelloberfläche gebunden hat, verhilft sie der MLA-Kette durch Endozytose in die Zelle, wonach das Protein zum Golgikomplex transportiert wird. Diese Ortsveränderung geschieht durch Internalisierung und dem folgenden retrograden Transport vom endosomalen Teil zum Golgiorgan und anschließend zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Der retrograde Transport ist möglich durch die Fähigkeit der MLB-Kette, mit den Rezeptoren zwischen den internen Kompartimenten zu interagieren. Es wurde herausgefunden, dass manche Rezeptoren nach der Bindung des Liganden zu dem Golgikomplex oder Endoplasmatischen Retikulum regelrecht geleitet werden. Das Toxin wird schließlich durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums wahrscheinlich mittels des Transportmechanismus fehlerhafter Proteine in das Zytosol transportiert, wo es katalytisch aktiv wird [Agapov et al. 1999a, 1999b, Llorente et al. 1998, Lord and Roberts 1998, Moisenovich et al. 2002, Niwa et al. 2003, Pelham et al. 1992, Sandvig and van Deurs 1996, 1999, Simpson et al. 1999]. Die MLA-Kette (N-Glykosidase) katalysiert die selektive Hydrolyse (Depurination) der N-glykosidischen Bindung an dem Adenin-4324-Rest in der hoch konservierten GAGA-Haarnadelschleife in eukaryotischer 28 S rRNS. Die 60 S-Untereinheit der Ribosomen ist deshalb unfähig den Elongationsfaktor 2 zu binden, welches zu einer Hemmung des Verlängerungsschrittes der Proteinsynthese und zu einer Einleitung des Zelltodes (Apoptose) führt [Eck et al. 1999a, Endo et al. 1988, Endo and Tsurugi 1987, Krauspenhaar et al. 1999, Sweeney et al. 1998].

Bevor ML I durch Translokation ins Zytosol gelangt, wird die MLB-Kette von der MLA-Kette getrennt, welches durch eine Reduktion der Disulfidbindung geschieht. Die MLA-Kette liegt ungefaltete vor [Agapov et al. 1999a, Eschenburg et al. 1998, Niwa et al. 2003, Simpson et al. 1999]. Neben der Disulfidbindung stabilisieren zahlreiche nicht-kovalente Wechselwirkungen in der gesamten Berührungsfläche der beiden Ketten die assoziierten Einheiten. Diese Wechselwirkungen scheinen ein wichtiges, strukturelles Merkmal für die Trennung der beiden Ketten zu sein, um die toxische Wirkung der MLA-Kette freizusetzen. Es ist anzunehmen, dass die Kettentrennung die hydrophobe Oberfläche zum Lösungsmittel hin freilegt und Umformungen an der MLA-Kette auslöst. Diese mutmaßliche Änderung kann verschiedene Funktionen sichern, welches die Aktivierung des Enzyms zur Folge hat, das als Heterodimer inaktiv ist [Krauspenhaar et al. 1999].

Konformationsänderungen des Toxins während der intrazellulären Durchquerung bleiben unklar [Agapov et al. 1999b, Simpson et al. 1999].

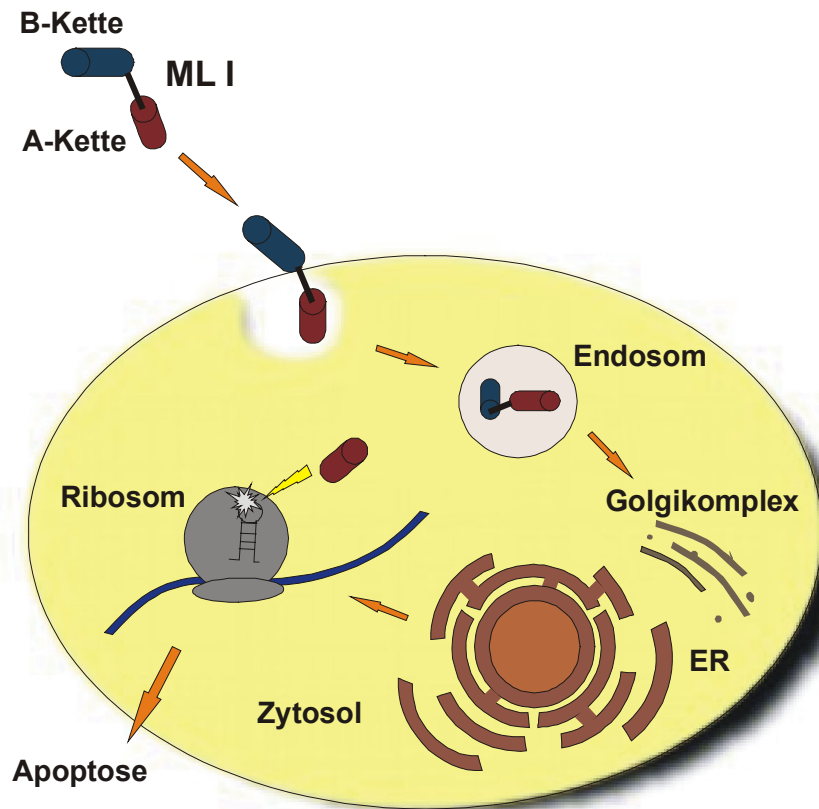


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Mistellektins I

Nachdem die MLB-Kette die MLA-Kette in die Zelle schleust, katalysiert die MLA-Kette die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung an dem Adenin-4324-Rest in der GAGA-Haarnadelschleife in eukaryotischer 28 S rRNS. Die 60 S-Untereinheit der Ribosomen ist unfähig den Elongationsfaktor 2 zu binden. Dieses führt zu einer Hemmung des Verlängerungsschrittes der Proteinsynthese und somit zu einer Einleitung der Apoptose.

Mistellektin I ist in Mechanismus, Struktur und Aminosäuresequenz den toxischen Pflanzenproteinen Ricin (aus *Ricinus communis*, 61 % Sequenzhomologie) und Abrin (aus *Abrus precatorius*, 54 % Sequenzhomologie) sehr ähnlich [Halling et al. 1985, Krauspenhaar et al. 1999, Tahirov et al. 1995], jedoch ist ML I weniger toxisch [Agapov et al. 1997, Eschenburg et al. 1998], welches eventuell auf unterschiedliche Zielzellrezeptoren und Endozytosewege zurückzuführen ist [Moisenovich et al. 2003].

2.2.1.3 Natürliche Wirkung und klinischer Einsatz

Die Ribosomen-inaktivierende Eigenschaft weist auf eine Rolle der Pflanzenverteidigung gegen Bakterien, Viren und Pilze hin. Lektine schützen die Pflanze vor Phytopathogenen während der Keimung und dem frühen Wachstum der Samen [Mirelman et al. 1975, Rüdiger 1978, Soler et al. 1998, Sweeney et al. 1998].

ML I zeigt auch kryoprotektive Eigenschaften, das heißt, dass es die Pflanzenzellmembran vor der Zerstörung durch Frost und Tauen mittels der Bindung der Galaktolipide schützt. Sobald die Bindung erfolgt, treten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Membran und Protein auf, die den Grad der Kryoprotektion bestimmen [Hinch et al. 1997, Sweeney et al. 1998]. Neben diesen Wirkungen zeigen Mistelextrakte auch DNS-stabilisierende Potenzen [Büssing et al. 1995, Kienle und Kiene 2004]. Das meiste ML I befindet sich in den Stängeln der Pflanze [Urech 2001].

ML I wird in der adjuvanten Tumorthherapie häufig genutzt [Eck et al. 1999a]. Es verbessert die Aktivität und die Anzahl der natürlichen Killerzellen im peripheren Blut, welches eine wichtige Rolle in der immunologischen Kontrolle von Tumorwachstum und der Bildung von Metastasen spielt [Menges et al. 1997, Weber et al. 1998]. Lektine besitzen eine Erythrozyten agglutinierende Wirkung [Franz 1990, Urech 2001]. Mistelextrakte werden als Immunmodulator bei der Behandlung begleitend oder nach Chemo- / Radiotherapie eingesetzt [Kovacs 2004]. Dabei erhöhen sie die Effektivität der Therapien und stimulieren Abwehrmechanismen gegen Krebszellen und nicht spezifische Immunreaktionen. Sie können das Wachstum von malignen Zellen hemmen [Zarkovic et al. 2001], verlängern die Überlebenszeiten, zeigen signifikante Ergebnisse über Begrenzung, Stillstand und vereinzelt Regression des Tumorwachstums, Verminderung der Rezidiv- und Metastasenrate und verbessern die Lebensqualität [Hajto et al. 1990, Heine 1985, Lyu et al. 2000, Matthiessen und Tröger 1995]. Es tritt eine gewünschte rhythmische Temperaturerhöhung auf, was als Ausdruck einer Aktivierung der Stoffwechselprozesse anzusehen ist [Goyert 1990, Hensel 1981].

Mistellektine aktivieren das Immunsystem, steigern Zahl und Aktivität der natürlichen Killerzellen und T_H -Zellen, setzen β -Endorphin frei, vermindern die Progredienz und mildern die Nebenwirkungen der Krebsstandardtherapie. Auch ein gesteigerter Aktivitätszustand der lymphatischen Zellen (IL2 und HLA-DR-Rezeptoren), eine signifikante Steigerung von Zytokinen IL1, IL6, IL10, IL12, $IFN\gamma$ und $TNF-\alpha$ im Serum und erhöhte Phagozytoseaktivität sind bei einer Behandlung mit Mistellektin zu verzeichnen (1 ng/kg

Körpergewicht) [Beuth et al. 1993, Eck et al. 1999b, Elsässer-Beile et al. 2000, Gabius und Gabius 1990, Matthiessen und Tröger 1995, Soler et al. 1996]. Abhängig von vielen Faktoren wie der Konzentration, Zelltyp und Mikroumgebung der Zelle, kann ML I nicht nur den Zelltod induzieren, sondern auch Zellen aktivieren. Es agiert sowohl als zytotoxisches Agens als auch als „Veränderer der biologischen Antwort“ [Moisenovich et al. 2003]. Tumorzellen zeigen oft ein verändertes, krebs-spezifisches Glykosylierungsmuster auf, welches eine bevorzugte Bindungsstelle für ML I repräsentiert und eine Erklärung für den im Vergleich zu normalen Zellen besonders starken zytotoxischen Effekt auf Krebszellen sein kann [Abuharbeid et al. 2004]. Krebszellen sind oft charakterisiert durch die Anwesenheit von tumorassoziierten Gangliosiden mit einem Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-Motiv (Lactosamine, Neolacto-Serie Oligosaccharide in der Glykosphingolipid-Terminologie). Angehäufte Expression von Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc-Epitopen auf hematopoietischen Zellen könnte eine Erklärung für die spezifische Immunstimulans sein [Müthing et al. 2004, 2005].

Antikörper, die sich unter einer Misteltherapie entwickeln, neutralisieren die toxische Wirkung von Mistelextrakten, was die Verträglichkeit von hohen Dosen erklärt. Daher ist eine „Einleitungstherapie“ mit niedrigen Dosen und langsamer Dosissteigerung notwendig [Matthiessen und Tröger 1995, Stettin et al. 1990]. Serunglykoproteine hemmen die Zytotoxizität der Lektine, weshalb Lektin enthaltende Mistelextrakte Krebspatienten ohne Nebenwirkungen verordnet werden können [Frantz et al. 2000].

Mistelextrakte werden standardisiert in Bezug auf den Gehalt von ML I, um reproduzierbare Untersuchungen der Dosisabhängigkeit zu erlauben [Schaffrath et al. 2001]. Erst die über eine Standardisierung hinausgehende Normierung führt zu einer konstanten, von der Herstellungscharge unabhängigen Aktivität. Das Verhältnis der Misteltoxine und die Lektinzusammensetzung im Extrakt variieren mit der Zubereitung, der Erntezeit, dem Wirtsbaum, dem Pflanzenteil usw. Deshalb ist es sehr wichtig den Extrakt zu standardisieren [Jäggy et al. 1995, Matthiessen und Tröger 1995, Tonevitsky et al. 1999]. Durch Standardisierung auf einen Inhaltsstoff oder auf eine bestimmte Wirkung wird allerdings nur die Konstanz des Inhaltsstoffes oder der Stoffgruppe, die an einer bestimmten Wirkung ursächlich beteiligt ist, gewährleistet. Zur Prozessstandardisierung gehören ein konstantes Verhältnis und festgelegte Mengen der verwendeten Pflanzenteile sowie definierte Erntezeiten und Mischungsverhältnisse der von der Jahreszeit abhängig gewonnenen Mistelsäfte. Für eine valide Prozessstandardisierung ist zu fordern, dass die Ergebnisse mit jenen der Inhaltsstoffstandardisierung vergleichbar sind [Matthiessen und Tröger 1995].

2.2.2 Rekombinantes Mistellektin I (rML I)

2.2.2.1 Struktur des rekombinanten Mistellektins I

Das intronfreie Mistellektingen wurde geklont [Eck et al. 1999a, Lentzen et al. 1998], wobei die Expression der Gensequenzen (isoliert aus *Viscum album* (Pappel-Mistel)) der einzelnen Ketten (rMLA und rMLB) in *Escherichia coli* in der Produktion von Einschlusskörpern resultiert, den sogenannten Inclusion Bodies [Lentzen et al. 1998].

Die vollständige cDNS von 1923 bp enthält eine Signalsequenz für ein Leader-Peptid von 33 Aminosäuren und eine interne Linkersequenz. Die rMLA-Ketten-Kodierungssequenz besteht aus 756 bp und die der rMLB-Kette aus 789 bp.

Die Gensequenzen wurden durch Insertion in pT7-7 Expressionsvektoren unter die Kontrolle des T7-RNA Polymerase Promotors sowie Transkriptionterminators gestellt. Mit den resultierenden Expressionsvektoren pT7-MLA und pT7-MLB wurde jeweils ein *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert [Eck et al. 1999a, 1999b]. Induziert wurde die Expression durch Zugabe von IPTG.

rMLA hat eine relative Molekülmasse von ca. 26 kDa und rMLB von ca. 30 kDa. Beide sind im Gegensatz zum natürlichen Mistellektin I (ML I) nicht glykosyliert. Die relative Molekülmasse des reassozierten Holoproteins beträgt 56 kDa [Eck et al. 1999a, 1999b, Schöffski et al. 2004].

Neben prokaryotischen Zellen können auch eukaryotische Zellen als Wirt dienen. Vorzugsweise sind dies neben dem Bakterium *E. coli*, eine *Aspergillus*-Zelle oder eine *Spodoptera frugiperda*-Zelle [Lentzen et al. 1998].

Das rML I besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,8, während das ML I einen pI-Wert zwischen 5,2 und 6,2 hat. rMLA hat einen pI-Wert von 6,4 und rMLB von 5,1. Bei einem pH-Wert von 7 – 9 ist das rML I stabil. Für rML I zeigt sich eine einheitliche Mobilität in der IEF-Chromatofokussierung, während sich für das ML I-Holoprotein aufgrund einer Vielzahl von Molekülvarianten eine Heterogenität ergibt [Eck et al. 1999a, 1999b, Lentzen et al. 1998].



Abbildung 2.4: Struktur des rekombinanten Mistellektins I

rot: rMLA-Kette, blau: rMLB-Kette, gelb: Disulfidbindungen, grün: freie Cysteine;
I-III: Domänen der Monomere; C: Carbonsäure-Ende, N: Amino-Ende

2.2.2.2 Klinische Wirkung

Rekombinante und natürliche Moleküle zeigen beide die gleichen galaktosespezifischen Bindungseigenschaften. Der IC_{50} -Wert des rML I *in vitro* entspricht dem des ML I und ist in etwa dreimal toxischer als von einem auf ML I standardisierten Mistelextrakt. Die ähnlichen Werte von rML I und ML I deuten an, dass die Glykosylierung keine zytotoxische Auswirkung hat. Zytokineninduktion ist jedoch höher bei der Behandlung mit standardisierten Mistelextrakten und ML I als beim rML I [Eck et al. 1999b, Elsässer-Beile et al. 2000, Schaffrath et al. 2001]. Betreffend der biologischen Aktivität wurden keine relevanten Unterschiede zwischen rML I und ML I gefunden [Eck et al. 1999b, Müthing et al. 2004]. *In vitro* induziert rML I Apoptose in niedrigen Konzentrationen (fM bis pM) und Nekrose bei höheren Konzentrationen (nM bis mM) [Schöffski et al. 2004].

rViscumin (rML I) wurde in Phase I [Habeck 2002, Müthing et al. 2005] klinischer Studien an Krebspatienten untersucht. Es wurde über eine zentrale, intravenöse Infusion an Patienten mit fortgeschrittenem, hartnäckig progressiven, festen Tumoren verabreicht, die zuvor chirurgisch, chemo-, radio- oder hormontherapeutisch behandelt wurden, jedoch keine Behandlung mit natürlichen Mistelpräparaten erhalten hatten. Enddarm-, Eierstock-, Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs sowie Nierenzellenkarzinom und Weichteilsarkoma waren die am häufigsten untersuchten Tumorarten. Dabei traten Nebenwirkungen wie Erschöpfung, Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Erbrechen, allergische Reaktionen, Gelenk- und Tumorschmerzen auf. Die empfohlene Dosis betrug für eine 1 h-Infusion zweimal pro Woche 5600 ng/kg und eine 24 h-Infusion einmal wöchentlich 5000 ng/kg Körpergewicht (6400 ng/kg ist die maximale tolerierte Dosis). Es zeigte sich, dass das rekombinante Protein eine kurze totale Halbwertszeit von 2,81 h besitzt. Die beste Antwort auf die Behandlung war ein stabiles Krankheitsbild [Schöffski et al. 2004, 2005].

2.3 Renaturierung von rekombinanten Proteinen

2.3.1 Rekombinante Proteine

Genrekombinante Pharmaka gewinnen in der Medizin mehr und mehr an Bedeutung und werden als Helfer zur Heilung von Krankheiten angenommen, die bis heute unbehandelbar sind. Die Lieferung vieler wertvoller Proteine (wie Hormone, Zytokine und Enzyme), die im klinischen und industriellen Bereich Anwendung finden, sind oft begrenzt durch ihre niedrige natürliche Verfügbarkeit. Die rekombinante DNS-Technologie hat die effiziente Produktion therapeutischer Proteine wie Insulin, Wachstumshormone, t-PA und Interferon erleichtert. Die verwendeten Expressionssysteme müssen für die Herstellung die Schlüsselkriterien wie beständige Produktqualität und Kosteneffektivität treffen [Misawa and Kumagai 1999, Schmidt 2004]. Die Wirtszelle hat einen großen Einfluss auf die Qualität und Quantität der produzierten rekombinanten Proteine. Eine Vielzahl von Wirten kann zur Produktion dieser Proteine eingesetzt werden. In Säugetierzellen werden z.B. biologisch aktive, rekombinante Proteine mit allen erforderlichen posttranslationalen Modifikationen erzeugt.

Prokaryonten fehlt gewöhnlich der metabolische Weg zur Glykosylierung. Sie sind jedoch für die Produktion von nicht-glykosylierten Proteinen und solch nativ glykosylierten Proteinen, die auch ohne Glykosylierung pharmazeutisch aktiv sind, die theoretisch geeignetsten Organismen (z.B. *Escherichia coli*-Stämme oder *Bacillus*-Stämme) [Schmidt

2004]. Prokaryonten werden eingesetzt, wenn die biologische Aktivität nicht von posttranslationalen Veränderungen abhängig ist [De Bernardez Clark 2001].

Für die Leistungsfähigkeit von Downstreamprozessen bieten sekretorische Expressionssysteme potenzielle Vorteile für die Produktion von rekombinanten Proteinen im Vergleich zu Einschlusskörper-formenden zytosolischen Systemen. Als sekretorische Systeme werden sowohl Prokaryonten, Hefen und filamentöse Pilze als auch Insekten- und Säugetierzellkulturen verwendet. Jedoch werden die in *E. coli*-Systemen hergestellten, vermarkteten Pharmaka meistens als Inclusion Bodies produziert, weil die Grundvoraussetzung für effektive Sekretion fehlt. Verursacht durch die Membranstruktur, den niedrigen Gehalt an Chaperonen und Foldasen sowie die hohe periplasmatische Proteasekonzentration erlaubt das *E. coli*-Sekretionssystem meist nur vergleichbar niedrige Produktausbeuten. Diese kann man aber z.B. durch Co-Klonierung und Co-Expression von Chaperonen und Foldasen verbessern [siehe Übersichtsartikel Schmidt 2004 und darin enthaltene Referenzen]. Obgleich das Produzieren eines inaktiven Zielproteins in Form von Einschlusskörpern, den sogenannten Inclusion Bodies, ein schwerwiegender Nachteil ist, zeigen sich mehrere Vorteile verglichen mit dem löslichen Gegenstück: eine sehr hohe Expressionsrate (mehr als 30 % der zellularen Proteine), leichte Isolierung und damit verbundener hoher Reinheitsgrad des Proteins in aggregierter Fraktion, Homogenität der Proteine in den Inclusion Bodies, welches die Aufreinigungsschritte mindert, und erhöhter Schutz vor proteolytischen Abbau [Singh and Panda 2005, Vallejo and Rinas 2004a, Walsh 2003]. Studien belegen, dass Proteinaggregation als Inclusion Bodies nicht notwendigerweise den Verlust der biologischen Aktivität bedeutet [García-Fruitós et al. 2005 und darin enthaltene Referenzen, Sánchez de Groot and Ventura 2006].

Die tiefgehende genetische und physiologische Charakterisierung, die kurze Generationszeit, die einfache Handhabung, das aufgebaute Fermentationswissen und schließlich die hohe Kapazität zum Anhäufen von Fremdproteinen haben *E. coli* zum meist verwendeten, sicheren und unbegrenzten Lieferanten für die rekombinante Proteinherstellung durch prokaryotische Organismen gemacht [Misawa and Kumagai 1999, Schmidt 2004].

Eine solche Überexpression von Proteinen beinhaltet Stabilität der mRNA sowie Leistungsfähigkeit zur Transkription mittels eines starken Promotors und Leistungsfähigkeit zur Translation [Baneyx 1999, Gold and Stormo 1990, Gross and Hollatz 1988, Misawa and Kumagai 1999, Sawers and Jarsch 1996].

2.3.2 Proteinfaltung

Proteine müssen sich in bestimmte räumliche Strukturen falten, um ihre biologische Funktion erfüllen zu können. Die Proteinfaltung ist ein sehr störanfälliger Prozess [Mogk et al. 2001]. In eukaryotischen Zellen sind bis zu 30 % der durch die Ribosomen synthetisierten Polypeptide defekt und werden kurz nach ihrer Synthese abgebaut [Markossian and Kurganov 2004, Schubert et al. 2000]. Missgefaltete und aggregierte Proteine in Zellen werden in lebenden Zellen durch ein evolutionär hochkonserviertes Schutzsystem kontrolliert. Das Reparatursystem besteht aus Chaperonen, wovon viele Hitzeschockproteine (Hsp) sind. Verschiedene Chaperonsysteme, wie DnaK (Hsp70), GroEL (Hsp60) und kleine Hitzeschockproteine (sHsps), dienen als ein solcher Schutzpuffer [Mogk et al. 2001]. Die Chaperone falten die falsch geformten Proteine zurück, bzw. werden die Proteine von Proteasen abgebaut, wenn eine Rückfaltung nicht möglich ist. Die Chaperonmaschinerie ist bei Überexpression überfordert, so dass proteolysestabile, unlösliche Proteinaggregate sich anhäufen. Es bilden sich Inclusion Bodies, die in der Regel funktional inaktiv sind und sowohl im Zytoplasma als auch Periplasma zu finden sind [Baneyx 1999, De Bernardez Clark 2001, Georgiou and Valax 1999, Rudolph and Lilie 1996]. Kleine Hitzeschockproteine findet man interessanterweise auch in Inclusion Bodies. Sie binden wahrscheinlich unter Stressbedingungen und übergeben die Inclusion Bodies nach Rückkehr in optimale Bedingungen an die Hsp60 und Hsp70 zur Renaturierung [Allen et al. 1992, Mogk et al. 2001]. Diese Aggregate entstehen, wenn gefaltete oder nicht gefaltete Intermediate hauptsächlich durch Kontakt mit ihren hydrophoben Oberflächen wechselwirken oder nicht-kovalente ionische Interaktionen eingehen und so einen großen, stabilen und kompakten Komplex mit teilweise vorhandenen Sekundärstrukturen bilden [Singh and Panda 2005]. Hervorgerufen wird diese Proteinmissfaltung z.B. durch Antwort auf Mutationen, posttranslationale Modifikationen oder Veränderungen der örtlichen Bedingungen wie pH-Wert oder Temperatur [Dobson 1999, Fink 1998, Markossian and Kurganov 2004]. Unter solchen Stressbedingungen sind auch nativ gefaltete Proteine in Gefahr, ihre Struktur zu verlieren und sich zu entfalten [Mogk et al. 2001]. Hohe Expressionsraten in *E. coli* von nicht-natürlichen, hydrophoben Proteinen (höher als 2 % der zellulären Proteine) führen vermehrt zur Akkumulation in Inclusion Bodies. Im Fall von Disulfid-verbundenen Proteinen ist die Aggregatbildung zu erwarten, da die reduzierende Umgebung des bakteriellen Zytosols die Bildung von Disulfidbindungen behindert. Der Durchmesser kugelförmiger, bakterieller Inclusion

Bodies variiert zwischen 0,5 – 1,3 μm . Sie haben eine von der Lage abhängige dichte, formlose oder parakristalline Struktur, sind trotz ihrer Dichte stark hydratisiert und weisen eine poröse Architektur auf. Inclusion Bodies besitzen eine höhere Dichte ($\sim 1,3 \text{ mg/mL}$) als viele andere Zellbestandteile, was bei der Abtrennung durch Hochgeschwindigkeits-zentrifugation nach dem Zellaufschluss ausgenutzt wird [De Bernardez Clark 2001, Georgiou and Valax 1999, Singh and Panda 2005, Taylor et al. 1986]. Aufgrund ihrer lichtbrechenden Struktur können Inclusion Bodies direkt in der lebenden Wirtszelle mit einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden [Rudolph and Lilie 1996].

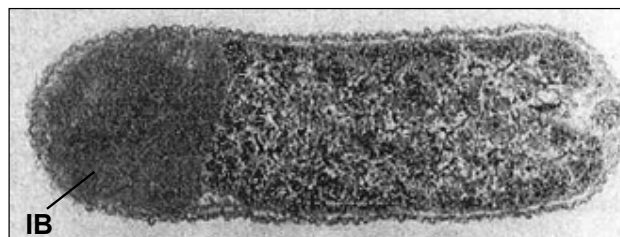


Abbildung 2.5: Mikroskopische Aufnahme von Inclusion Bodies-Ablagerungen (IB) in *E. coli* [Ausschnitt einer Abbildung aus Fahnert et al. 2004]

Inclusion Bodies werden im Allgemeinen durch mechanische Zerstörung der Zellen mittels Ultraschall für kleine, French Press für mittlere und Hochdruckhomogenisator für große Volumina erhalten. Die meisten Verunreinigungen in der Inclusion Bodies-Fraktion nach der Abtrennung durch Zentrifugation sind Außenmembranproteine und kleine Hitzeschockproteine (z.B. IbpA und/oder IbpB). Diese Verunreinigungen leiten sich vermutlich von Co-Präzipitation bei der Überexpression fremden Genprodukts ab. Sie können eine Minderung der Rückfaltungsausbeute verursachen. Die Zugabe von Detergenzien wie Triton X-100 und/oder niedrige Konzentrationen chaotroper Agenzien sowohl vor dem Zellaufschluss als auch für den Waschschrift erlaubt die Entfernung der Membranproteine oder unspezifischer Zelltrümmer von den Inclusion Bodies [Allen et al. 1992, De Bernardez Clark et al. 1999, Maachupalli-Reddy et al. 1997, Middelberg 2002, Rinas and Bailey 1992, Rudolph and Lilie 1996, Vallejo and Rinas 2004a]. Eine Reinheit von $> 95 \%$ kann unter optimalen Bedingungen erreicht werden.

Chelatbildene Agenzien wie EDTA werden eingesetzt, um metallkatalysierte Sauerstoff-oxidationen der Cysteine zu verhindern [Khan et al. 1998, Rudolph and Lilie 1996, Singh and Panda 2005, Vallejo and Rinas 2004a].

Nach ihrer Isolierung bringt man gewöhnlich die Inclusion Bodies in Lösungen, die hohe Konzentrationen von chaotropen Agenzien wie Guanidin Hydrochlorid (6 M) oder Harnstoff (6 – 8 M) oder Detergenzien enthalten. Guanidin Hydrochlorid wird aufgrund seiner hervorragenden chaotropen Eigenschaften bevorzugt, da Harnstoff spontan Cyanate bilden kann. Diese Cyanate können die freien Aminogruppen des Proteins carbamylieren. Die Solubilisierung mit Harnstoff ist nicht für alle Proteine einsetzbar und darüber hinaus pH-abhängig [Estepé and Rinas 1996, Fischer et al. 1993, Hagel et al. 1971, Vallejo and Rinas 2004a]. Die Proteine, die mit Detergenzien gelöst werden, haben eine geordnetere Struktur als solche die mit chaotropen Reagenzien in Lösung gebracht werden [Gierasch et al. 1982, Tsumoto et al. 2003].

Eine Zugabe von Thiolreagenzien niedrigen Molekulargewichtes (wie Dithiotreitol (DTT) oder 2-Merkaptoethanol) führt zur Reduzierung der nicht-nativen inter- und intramolekularen Disulfidbindungen, die beispielsweise durch Sauerstoffoxidation beim Zellaufschluss entstanden sind. Dabei werden die Cysteine in ihrer reduzierten Form gehalten. Optimale Bedingungen für die Zerstörung der vorhandenen Disulfidbindungen wurden bei milden alkalischen pH-Wert gefunden, weil der nukleophile Angriff auf die Disulfidbindung durch die Thiolatanionen ausgeführt wird [De Bernardez Clark et al. 1999, Vallejo and Rinas 2004a]. Sollte die Reinheit der Inclusion Bodies zu niedrig sein, kann eine Aufreinigung durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie in Anwesenheit eines denaturierenden Reagenz erreicht werden. Nach dem Lösen der Inclusion Bodies müssen überschüssige, denaturierende und reduzierende Reagenzien entfernt und die reduzierten Proteine in oxidierende Bedingungen überführt werden [Misawa and Kumagai 1999].

Inclusion Bodies-Rückfaltungsprozesse spielen in der Produktion von rekombinanten Proteinen eine wichtige Rolle. Eine Verbesserung der Renaturierungsausbeuten durch Minimierung von Aggregation und Reduzierung von chemischen Kosten sind der Schlüssel für die industrielle Realisierung dieser Prozesse [De Bernardez Clark 2001].

Die Technologie für Proteinrückfaltung sollte folgende Kriterien erfüllen:

- übertragbarer Maßstab (Scale up, Scale down)
- einfache Automatisierung
- unspezifisch für einen breiten Bereich von ähnlichen Proteinen
- ökonomisch [Middelberg 2002].

Sind die richtigen Bedingungen für die Renaturierung gefunden, kann der Rückfaltungsprozess ein paar Sekunden oder ein paar Tage benötigen. Dabei konkurriert die korrekte Rückfaltung mit Missfaltungen und Aggregationen. Die Proteinrückfaltung betrifft intramolekulare Wechselwirkungen und folgt normalerweise einer Kinetik erster Ordnung, während sich die Aggregationen auf intermolekulare Wechselwirkungen höherer Kinetikordnungen beziehen. Aufgrund dieser kinetischen Konkurrenz nehmen die Renaturierungsausbeuten korrekt gefalteter Proteine gewöhnlich (unabhängig von der Faltungsmethode) mit Zunahme der Ausgangsproteinkonzentration ab [Kiefhaber et al. 1991, Vallejo and Rinas 2004a, Zettlmeissl et al. 1979]. Proteinkonzentrationen im Bereich von 10-50 µg/mL sind gebräuchlich [Rudolph and Lilie 1996].

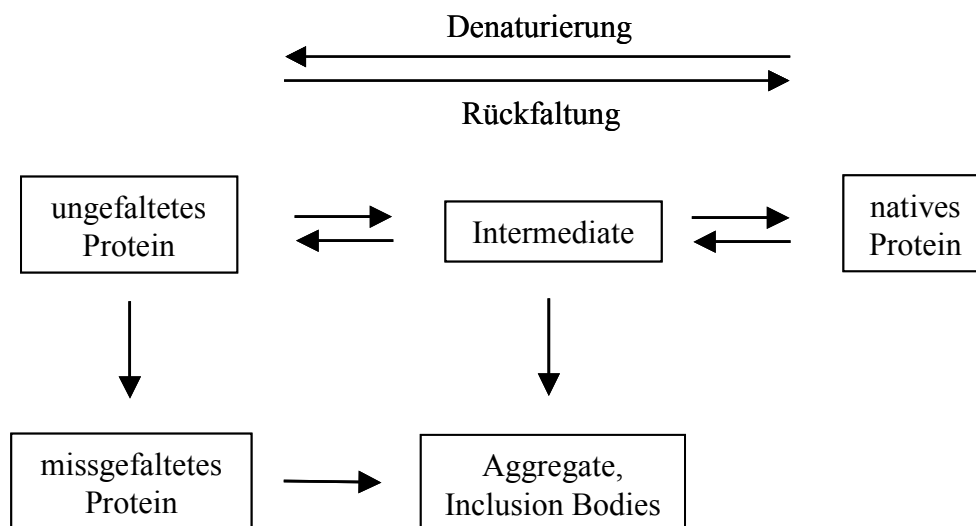
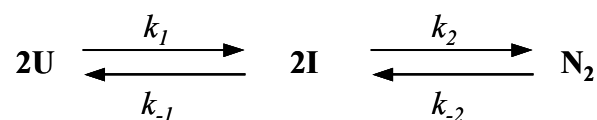


Abbildung 2.6: Allgemeines Modell der *in vitro*-Proteinrückfaltung

Bei einer Reaktion, bei der aus Monomeren ein Homodimer entsteht, während ein Zwischenzustand durchlaufen wird, kann in vereinfachter Form die Reaktionsfolge folgendermaßen aussehen:



$$\frac{d[U]}{dt} = k_{-1}[I] - k_1[U] \quad (2.1)$$

$$\frac{d[N_2]}{dt} = k_2[I]^2 - k_{-2}[N_2] \quad (2.2)$$

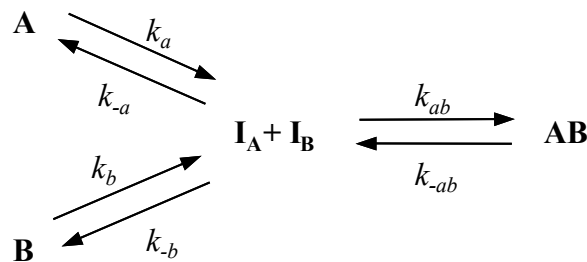
U = ungefaltetes Protein

I = Intermediat

N = natives Protein

k_x = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Bei einer Reaktion, bei der ein Heterodimer entsteht, ist folgender Zustandsübergang möglich:



$$\frac{d[A]}{dt} = k_{-a}[I_A] - k_a[A] \quad (2.3)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_{-b}[I_B] - k_b[B] \quad (2.4)$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_{ab}[I_A][I_B] - k_{-ab}[AB] \quad (2.5)$$

Verschiedene Techniken zur Produktion von rekombinanten Proteinen können eingesetzt werden. Es muss jedoch für jedes Protein die optimale Methode herausgefunden werden, da schon eine kleine Modifikation eines Proteins nach einer anderen Technik verlangen kann.

Die einfachste und am meisten verwendete Methode ist die Verdünnung der konzentriert gelösten, denaturierten Proteine in einem Rückfaltungspuffer durch satzweise, pulsweise oder kontinuierliche Zugabe. Diese Technik ist annähernd maßstabsübertragend und erlaubt eine einfache Untersuchung auf Additive und Redoxreagenzien [Armstrong et al. 1999, Middelberg 2002]. Aufgrund der dominanten Präzipitation bei hohen Proteinkonzentrationen muss oft eine sehr hohe Verdünnung durchgeführt werden [Rudolph and Lilie 1996]. Die Zugabe der denaturierten Proteine sollte langsamer sein als der die Faltungsgeschwindigkeit bestimmende Schritt des Zielproteins. Dadurch wird die Anhäufung von

Intermediaten, die zur Aggregation neigen, vermieden [Katoh and Katoh 2000, Vallejo and Rinas 2004a].

Weitere Techniken wie Dialyse, Diafiltration, verschiedene Chromatographiesysteme (z.B. Hydrophobe Interaktions-, Affinitäts- oder Größenausschlusschromatographie) und matrix-unterstützte Proteinfaltung (z.B. Ionenaustauscherharze) kommen ebenfalls zum Einsatz [Misawa and Kumagai 1999, Rudolph and Lilie 1996, Singh and Panda 2005, Vallejo and Rinas 2004a]. Das Ziel der Renaturierung mit gepackten Säulen ist einzelne Proteinmoleküle räumlich zu trennen, was Aggregation verhindern kann [Creighton 1986, Middelberg 2002]. Der Erfolg hierbei ist sehr proteinspezifisch, da die Protein-Matrix-Wechselwirkung auch die Rückfaltung verhindern kann [Stempfer et al. 1996, Middelberg 2002].

Bei den Faltungstechniken spielen sowohl die physikalischen Bedingungen (z.B. Temperatur, Druck und Ionenstärke) als auch chemische und biologische Rückfaltungshelfer eine große Rolle. Die wichtigste physikalische Variable, welche die Renaturierungsausbeute beeinflusst, ist die Temperatur, die einen Doppeleffekt ausübt. Zum einen beeinflusst sie die Renaturierungsgeschwindigkeit, zum anderen die Neigung zur Aggregation. Es gibt für jedes Protein einen bestimmten Temperaturbereich in einem gegebenen Puffersystem, in dem es thermodynamisch stabil ist. Im Allgemeinen ist die hydrophobe Aggregation bei niedrigen Temperaturen unterdrückt und die Faltungsgeschwindigkeit verlangsamt, so dass die Zeit für die Renaturierung zunimmt. 15 °C wird als Ausgangswert zur Rückfaltungsoptimierung eines neuen Proteins empfohlen [De Bernardez Clark et al. 1999, Vallejo and Rinas 2004a, 2004b, Yoshii et al. 2000].

Das bekannteste chemische Faltungsadditiv ist *L*-Arginin (0,4 – 1 M), das die Bildung von Aggregaten durch Verbesserung der Löslichkeit hemmt, indem es die hydrophoben Regionen partiell gefalteter Ketten schützt. Die Wechselwirkung der Guanidinstruktur des Arginins mit den Tryptophanresten des Proteins weist auf einen Weg zur Reduzierung der Aggregation hin [De Bernardez Clark et al. 1999, Singh and Panda 2005, Tsumoto et al. 2004, Vallejo and Rinas 2004a]. Trotz der Guanidinstruktur destabilisiert es die native Form nicht so stark wie Guanidin Hydrochlorid [Misawa and Kumagai 1999, Rudolph and Lilie 1996]. Verschiedene Detergenzien und Phospholipide in Form von Micellen und Liposomen werden zur Renaturierung eingesetzt. Ebenfalls werden andere Additive z.B. mit hohem Molekulargewicht wie Polyethylenglykol oder nicht-detergente Zwitterionen niedrigen Molekulargewichts wie Sulfobetain, Pyridin und 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure (CHES) oder Protein stabilisierende Agenzien wie Glycerin und Zucker

verwendet. Sie erhöhen sowohl die Löslichkeit als auch die Stabilität der ungefalteten und gefalteten Proteine. Aber auch Chaperone verwendet man erfolgreich. Mit ihnen ist eine Nachahmung der *in vivo*-Faltungsbedingungen möglich, was jedoch eine kostspielige Methode darstellt und eine Entfernung der Helferagenzien erforderlich macht [Goldberg et al. 1995, Vallejo and Rinas 2004a, 2004b, Yoshimoto et al. 2000]. Die Idee, kleine Moleküle als Additive zu verwenden, kommt von *in vivo*-Aktivitäten. Wasser-gestresste (hoher oder schwankender Salzgehalt, Austrocknung oder Frost) Organismen brauchen sie zum Stabilisieren der Proteine. Sie werden als Osmolyte und chemische Chaperone bezeichnet. Manche von ihnen erleichtern effektiv die Faltung und stabilisieren die Proteine oder erhöhen die Löslichkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Additive umfassen Zucker, Polyole, einige Salze wie Ammoniumsulfat und Magnesiumchlorid sowie bestimmte Aminosäuren wie Glycin und Alanin [Arakawa and Timasheff 1982, Bourot et al. 2000, Kopito 1999, Tsumoto et al. 2003, Yancey et al. 1982].

Die Rückfaltung von Proteinen mit Disulfidbindungen können Faltungswege über Intermediate mit sich bringen, die nicht-native Disulfide beinhalten. Diese Intermediate bestehen aus einer halb-nativen Struktur, die oft im metastabilen Zustand vorliegt [Karplus and Weaver 1994, States et al. 1984]. Disulfidbindungen werden effizienter gebildet, wenn ein Redoxsystem (z.B. Glutathion in reduzierter und oxidierte Form) im Rückfaltungspuffer vorliegt.

Die besten Bedingungen für die Renaturierung eines Disulfid-verbundenen Proteins liegen meist vor, wenn die reduzierte Form im Übermaß vorhanden ist und ein pH-Wert im schwach alkalischen Bereich besteht [Rudolph and Lilie 1996, Vallejo and Rinas 2004a]. Die Rückfaltung wird normalerweise im pH-Bereich von pH 8 – 9 durchgeführt, um eine Thiolatanionenbildung und damit Disulfidbindungen zu fördern [Middelberg 2002, Xie et al. 1998].

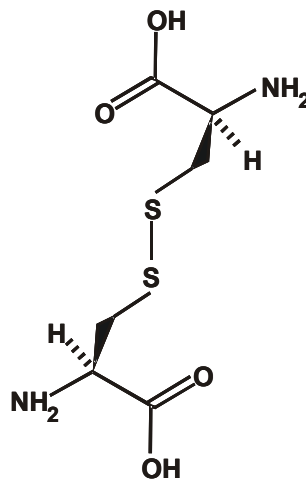
Disulfidbindungen führen zu einem Konformationszwang in einem Polypeptidgerüst, um dessen Stabilität zu verbessern. Die verbesserte Stabilität bedeutet eine bessere Resistenz gegen Umgebungsextrema, wie hohe Temperaturen, sehr saure oder basische pH-Werte, hohe Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln und erhöht die Halbwertszeit von Proteintherapeutika [Bulaj 2005, Mansfeld et al. 1997].

Der Bildungsmechanismus von Disulfidbindungen in Proteinen beinhaltet eine Serie von Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen zwischen Cysteinithiolaten und einem oxidierenden

Disulfid. Die Oxidation von Cysteinthiolaten der Proteine (deprotonierte Thiol-SH-Gruppen) kann durch spezialisierte Enzyme wie Proteindisulfidisomerase, Disulfidreagenzien mit niedrigem Molekulargewicht wie Cystin, Cystamin, oxidiertem Glutathion, DTT oder durch andere elektronenakzeptierenden Reagenzien wie Sauerstoff (Luft), Iod, Dimethylsulfoxid, Diamid und Kaliumferricyanid umgesetzt werden [Bulaj 2005]. Eine Sauerstoffoxidation in Anwesenheit eines Metallkatalysators ist die einfachste Methode, um Proteine zu oxidieren [Rudolph and Lilie 1996, Singh and Panda 2005].

Der Thiol/Disulfid-Austausch ist eine Zwei-Elektronen-Oxidationsreaktion, bei der die oxidierenden Gruppen von dem Disulfidreagenz zu den Cysteinthiolaten übertragen werden. Die Bildung einer Disulfidbindung ist ein reversibler Zweischrittprozess und beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen [Bulaj 2005, Creighton 1997].

A)



B)

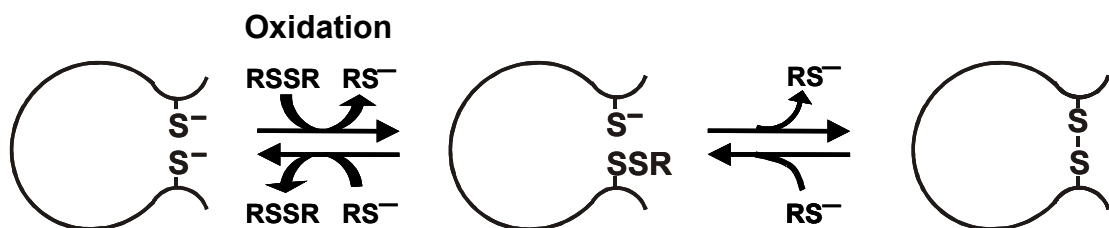


Abbildung 2.7: Disulfidbindungen

A) Cystin: Disulfidbindung zwischen zwei Cysteinen; B) Bildung einer Disulfidbindung

Wenn ein Zielprotein Disulfidbindungen enthält, sollte der Rückfaltungspuffer durch ein Redoxsystem ergänzt werden. Eine Oxidation kann durch Verwendung einer Mischung

von oxidierten (RSSR) und reduzierten (RS^-) Thiolreagenzien niedrigen Molekulargewichtes erreicht werden. Die am häufigsten verwendeten Thiole sind Glutathion (GSH/GSSH), DTT/GSSH, Cystein/Cystin und Cysteamin/Cystamin im Konzentrationsbereich von 5 – 15 mM in einem Verhältnis von 1 : 1 bis 10 : 1 [Fischer et al. 1993, Lilie et al. 1998, Misawa and Kumagai 1999, Singh and Panda 2005, Vallejo and Rinas 2004a].

Die Proteinfaltung stellt einen sehr komplexen Prozess dar, der nicht-kovalente Wechselwirkungen im ganzen Molekül, viele Freiheitsgrade und eine feine Balance zwischen Enthalpie und Entropie der freien Energie beinhaltet [Caflisch 2004]. Treibende Kraft der Proteinfaltung ist die Zusammenlagerung von hydrophoben Aminosäuren, die versuchen, der polaren Umgebung zu entkommen [Mogk et al. 2001]. Mit ansteigender Größe (molare Masse) tendieren Proteine dazu, als oligomere Strukturen vorzuliegen. Unterhalb von 30 kDa existieren Proteine gewöhnlich als Monomere, über 50 kDa sind Monomere-Strukturen eher selten. Die Assoziation von Untereinheiten ist wahrscheinlich ein Hinweis auf die Stabilisierung der einzelnen, gefalteten Ketten, da diese ungeschützte hydrophobe Seitenketten oder andere Charakteristika wie Schleifen besitzen, die ein mögliches Ziel für eine Proteolyse *in vivo* sein können. Der Faltungsweg kann als Serie von Faltungs- (1. Ordnung) und Assoziationsschritten (2. Ordnung) beschrieben werden [Price 1994].

Ein Protein kann von vielen verschiedenen entfalteten Zuständen aus die native Form erreichen [Mogk et al. 2001]. Proteinfaltung wird sowohl durch kinetische als auch durch thermodynamische Faktoren definiert. Hierbei sind die kinetischen Faltungsmerkmale mit den vektoriellen Eigenschaften der Proteinsynthese verbunden und die thermodynamischen Faltungsmerkmale entstehen durch die Notwendigkeit der Energieminimierung von gefalteten Polypeptidketten. Resultierend aus der Faltung ist die native Struktur von Polypeptiden meist die thermodynamisch stabilste Anordnung [Dobson et al. 1998, Jänicke 1991, Markossian and Kurganov 2004]. Sämtliche nicht-native Konformationen besitzen eine höhere Energie als die native Struktur [Mogk et al. 2001]. Es könnte sich aber bei der nativen Struktur auch um ein lokales Minimum der Gibbs-Energie handeln, dessen Energiebarriere zu einem thermostabileren Zustand zu groß ist, um sie ohne Systemveränderungen zu überwinden [Gazit 2002]. Aber unabhängig von der Komplexität der Kinetik des Renaturierungsmechanismus, also die Überwindung der verschiedenen Aktivierungsbarrieren, hängt das Ergebnis der richtigen Faltung davon ab, dass die algebraische Summe aller energetischen und entropischen Beiträge zur freien Enthalpie einen negativen Wert liefert [Renner et al. 1989]. Es gibt verschiedene Faltungswege, die schneller oder langsamer die native Struktur erreichen. Es müssen teilweise nur sehr kleine

Energiebarrieren überschritten werden, um eine Formationsänderung zu bewirken. Die Geschwindigkeit des Faltungsprozesses und die Ausbeute korrekt gefalteter Proteine sind je nach Protein unterschiedlich. Sehr kleine Proteine falten in der Regel vermutlich eigenständig. Proteine mit großen Molekulargewicht, die aus mehreren Domänen bestehen, weisen häufig Faltungsprobleme auf. Diese Faltung wird *in vivo* durch das Chaperon-system zur nativen Struktur begleitet [Mogk et al. 2001].

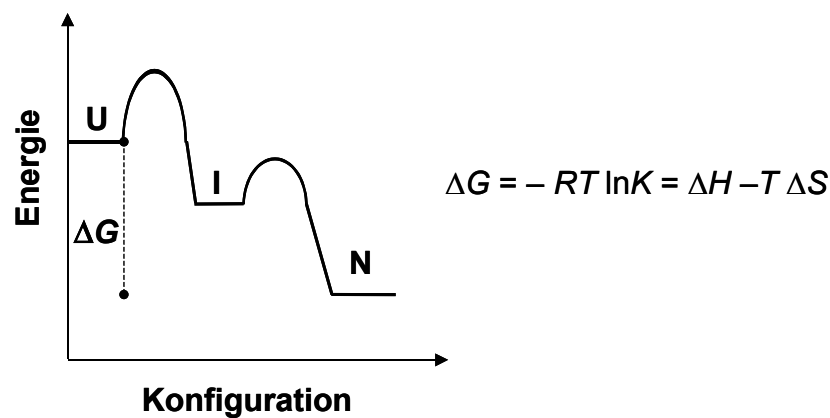


Abbildung 2.8: Schematisches Energieprofil

U: ungefaltetes Protein, I: Intermediat, N: natives Protein; R : Gaskonstante, T : absolute Temperatur, K : Gleichgewichtskonstante, ΔG : freie Energieänderung zwischen ungefalteten und nativen Protein, ΔH : Enthalpieänderung und ΔS : Entropieänderung zwischen ungefalteten und nativen Protein. Es muss eine Energiebarriere überwunden werden, um den anderen Zustand zu erreichen.

3. Material und Methoden

3.1 Produktion von rMLA und rMLB

3.1.1 Mikroorganismen und Vektorsystem

Für die Produktion der Inclusion Bodies wurden die von der BRAIN AG (Biotechnology Research And Information Network AG, Deutschland) zur Verfügung gestellten nicht pathogenen Laborstämme *Escherichia coli* BL21/pT7-MLA (*E. coli* BL21 strain [F-ompT hsdS_B(r_B-m_B-) gal dcm (DE3) pLysS(Cam^R)], Invitrogen Corp., Kalifornien, USA) und *Escherichia coli* BL21/pT7-MLB (*E. coli* BL21 strain [F-ompT hsdS_B(r_B-m_B-) gal dcm (DE3) pLysS(Cam^R)], Novagen[®], Deutschland) verwendet.

Die intronfreie Gensequenz der gesamten cDNS von *Viscum album*-ML I (Pappel-Mistel) enthält 1923 bp mit einer Signalsequenz für ein Leader-Peptid von 33 Aminosäuren und einer internen Linkersequenz. Die A-Kette-kodierende Sequenz besteht aus 756 bp und die B-Kette aus einem 789 bp-Fragment. Die Gensequenzen wurden durch Insertion in pT7-7 Expressionsvektoren (Worthington, Biochemical Corp., New Jersey, USA) unter die Kontrolle des T7-RNA Polymerase Promotors sowie Transkriptionsterminators gestellt [Eck et al. 1999a, 1999b, Studier and Moffatt 1986]. Mit den resultierenden Expressionsvektoren pT7-MLA und pT7-MLB wurde jeweils ein *E. coli*-Expressionsstamm BL21 transformiert. Beide Expressionssysteme enthalten ein Ampicillinresistenzgen [genaue Angaben zur DNS-Sequenz und Klonierung sind bei Eck et al. 1999a, 1999b zu finden].

Um einen Einfluss der freien Cysteine auf die Renaturierung zu untersuchen, wurde das Expressionsplasmid pT7 rMLB C21S-C194S (Cysteine wurden durch Serine ersetzt, erhalten durch Dr. M. Langer, Viscum AG, Deutschland), in dem keine freien Cysteine vorhanden sind, ebenfalls in *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen[®], Deutschland) transformiert.

3.1.2 Transformation des pT7 rMLB C21S-C194S-Stammes (mrMLB)

Als Transformation bezeichnet man die Konversion von einem Genotyp zu einem anderen durch von außen hinzukommende DNS. Dieses beinhaltet die direkte Aufnahme von DNS-Molekülen und die stabile Weitergabe dieser Information.

3.1.2.1 Kompetente Zellen: *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Kompetente Zellen sind Bakterienzellen, die für eine Transformation zugänglich sind. Das gramnegative Bakterium *E. coli* besitzt keine „natürliche Kompetenz“. Sie werden derart behandelt, dass sie in der Lage sind, Plasmid DNS aus ihrem Umfeld aufzunehmen.

Die verwendeten Medien sind dem Kapitel 3.1.4 zu entnehmen. Von einer LB-Agar-Platte mit *E. coli* BL21 (DE3) wurde eine Kolonie entnommen und in 10 mL LB-Medium in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikane über Nacht bei 37 °C geschüttelt kultiviert. Von dieser Vorkultur wurde ein Inokulum auf 200 mL LB-Medium gegeben (gewünschte $OD_{\lambda 600}$ von 0,1). Diese Kultur wurde bei 37 °C unter Schütteln bis auf eine $OD_{\lambda 600}$ von 0,5 wachsen gelassen, für 15 min auf Eis gekühlt und 15 min bei 5850 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in eiskaltem, sterilen Milli-Q-Wasser (200 mL und 100 mL) gewaschen und anschließend in 20 mL eiskaltem, sterilen 10 %-igen Glycerin aufgenommen. Nach der Aufnahme in 20 mL hat man die Zellen nochmals zentrifugiert und in 600 µL 10 %-igem Glycerin resuspendiert.

Die Zellkonzentration sollte bei $2 - 5 \cdot 10^{10}$ Zellen/mL liegen. Diese Zellsuspension wurde auf gekühlte, sterile Reaktionsgefäße von je 40 µL aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert [modifizierte Methode nach Miller 1994].

3.1.2.2 Elektrottransformation (Elektroporation)

Bei dieser Technik wird mittels eines kurzen Pulses mit sehr hoher Voltzahl eine reversible Membranpermeabilität hervorgerufen, wodurch die fremde DNS von den überlebenden Zellen aufgenommen wird [Miller 1994].

Expressionsplasmid pT7 rMLB C21S-C194S (515 ng/µL TE-Puffer, erhalten von der Viscum AG, Deutschland):

1 µL des Plasmids (pT7 ~ 2,5 kb) wurden mit 9 µL sterilem Milli-Q-Wasser verdünnt, so dass eine Konzentration von 51,5 ng/µL vorlag. Die übliche Konzentration für Transformationen sind 10 – 100 ng/µL. Die Transformationsleistungsfähigkeit nimmt mit zunehmender Plasmidgröße ab [Hanahan 1983], weshalb die Konzentration bei größeren Plasmiden höher sein sollte.

40 µL der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 1 µL der Plasmidlösung wurde zu den Zellen gegeben, kurz geschüttelt, sofort wieder auf Eis gestellt und eine Minute inkubiert.

Das Elektroporationsgerät wurde folgendermaßen eingestellt:

Spannung: 2,5 kV

Kapazität: 25 μ F

Pulse controler: 200 Ω

Das Plasmid-Zellgemisch wurde in die eiskalte Elektroporationsküvette gegeben und anschließend in das Gerät gestellt, um das Plasmid durch einen Puls in die Zelle zu transformieren. Die Zeitkonstante sollte dabei bei 5 ms (meist 4,5 – 4,8 ms) liegen. Die Zellen wurden sofort zu 960 μ L LB-Medium ohne Antibiotika gegeben und für 30 – 45 min bei 37 °C (120 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 100 μ L LB-Medium mit Ampicillin aufgenommen und auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Über Nacht wurden die Platten bei 30 °C inkubiert und am nächsten Tag zwei Klone isoliert. Diese wurden, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, kultiviert und eine Stammkultur angelegt.

3.1.3 Stammhaltung

Wie unter Kapitel 3.1.4 beschrieben, wurden zunächst Kulturen angezogen und bei einer $OD_{\lambda 600}$ von 0,6 der Kultur (definiertes Medium) geerntet. 750 μ L der Kultur wurden mit 750 μ L sterilem 87 %-igen Glycerin versetzt und bei –70 °C gelagert.

3.1.4 Kultivierung

Nach der Autoklavierung wurde zu allen Medien Ampicillin (50 g/L Stammlösung; Endkonzentration: 50 mg/L, sterilfiltriert) gegeben.

Tabelle 3.1: Luria Bertani-(LB)-Medium, pH 7

Komponente	Konzentration [g/L]
Trypton	10,00
Hefeextrakt	5,00
NaCl	7,00
LB-Agar-Platten:	
Agar	15,00

Tabelle 3.2: Definiertes Medium, pH 7

Komponente	Konzentration [g/L]
Glukose-Monohydrat	12,00 (Vorkultur/Erlenmeyerkolben) 20,00 (10-Liter-Batchkultur)
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1,20
KH ₂ PO ₄	13,30
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,00
Citronensäure-Monohydrat	1,70
Spurenelemente	Konzentration [g/L]
Fe(III)Citrat	0,1008
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,0025
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	0,0150
CuCl ₂ • 2 H ₂ O	0,0015
H ₃ BO ₃	0,0030
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0,0021
Zn(CH ₃ COO) ₂ • 2 H ₂ O	0,0338
EDTA	0,0141

3.1.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Von den beiden Stämmen *E. coli* BL21/pT7-MLA und BL21/pT7-MLB wurden über Nacht bei 30 °C LB-Agar-Platten angezogen.

Die Vorvorkulturen wurden in 10 mL LB-Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einer Impföse der LB-Agar-Platten-Kulturen angeimpft und ca. 6 h (30 °C, 120 rpm) inkubiert.

Anschließend sind 100 mL definiertes Medium als Vorkultur (1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikanen) mit 1 mL LB-Vorvorkultur versetzt und über Nacht (30 °C, 120 rpm) bebrütet worden.

Die gewünschte $OD_{\lambda 600}$ für das Überimpfen der Kultur in definiertem Medium betrug 0,1.

Bei einer $OD_{\lambda 600}$ von 0,5 fand eine Induzierung der Synthese der Mistellektinproteine mit 0,5 mM IPTG (Zugabe von 1 M sterilfiltrierter IPTG-Stammlösung) statt. Vor der Induktion und anschließend jede Stunde wurden fünfmal 1 mL-Proben entnommen, abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet eingefroren.

3.1.4.2 Kultivierung im Bioreaktor

Der rMLA- und rMLB-Stamm wurden als Batchkultur zur Produktion von Inclusion Bodies in 10 Litern definiertem Medium in einem Bioreaktor von Giovanola Frères (Schweiz) kultiviert. 500 mL Vorkultur wurden wie bei den Schüttelkolbenkulturen (Kapitel 3.1.4.1) beschrieben hergestellt und ein Teil als Inokulum eingesetzt, so dass eine $OD_{\lambda 600}$ von 0,1 im Reaktor zum Zeitpunkt des Kultivierungsbeginns vorlag. Die Reaktoren waren mit Sonden zur Messung von pH-Wert, Temperatur, pO_2 und Abgasanalytik versehen. Nebenbei wurde der Glukoseverbrauch mit einem Glukoseanalysator verfolgt und die Biotrockenmasse bestimmt (Kapitel 3.1.4.3 und 3.1.4.4).

Kultiviert wurde bei einer Temperatur von 30 °C und einer Anfangsrührerdrehzahl (Blattrührer) von 100 rpm, die bei Erreichen von 20 % pO_2 erhöht wurde. Der pO_2 wurde auf 20 % Sättigung bei einem Zuluftstrom von 0,5 vvm gehalten. Die pH-Wert-Regulierung erfolgte über die Zugabe von 12,5 %-iger Ammoniaklösung und 0,33 M Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 7. Mit Erreichen einer $OD_{\lambda 600}$ von ca. 5 wurde eine Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von 0,5 mM IPTG initiiert.

3.1.4.3 Glukose-Bestimmung

Die Proben wurden abzentrifugiert und der Überstand mit Milli-Q-Wasser verdünnt (messbare Konzentration < 10 g/L). Anschließend wurde dieser in einem Glukoseanalysator nach Programmvorschrift vermessen.

Tabelle 3.3: Lösungen für die Messung im Glukoseanalysator

Lösung	Komponente / Konzentration
Glukoseanalysatorpuffer	0,62 g $K_2H_2EDTA \cdot H_2O$ 1,02 g Na-Benzolat 1,68 g Na_2HPO_4 7,66 g NaH_2PO_4 3,01 g NaCl in 900mL Milli-Q-Wasser
Gentamicinsulfatlösung	0,059 g/mL Stammlösung 2 mL/900 mL Glukoseanalysatorpuffer

3.1.4.4 Bestimmung der Biotrockenmasse

In zuvor gewogenen Reaktionsgefäßen wurden 1mL-Proben abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In einem Trockenschrank (60 °C unter Vakuum) trocknete das Pellet und das Gefäß wurde nach dem Abkühlen erneut gewogen.

3.2 Aufarbeitung von rMLA und rMLB

3.2.1 Zellaufschluss durch Ultraschall

Beim Zellaufschluss mittels Ultraschall (kleine Volumina) wird durch eine hohe, rasch wechselnde Druckänderung (Kavitation) ein Zerreißen der Zellwände/-membran verursacht.

Tabelle 3.4: Zellaufschluss- und Waschpuffer [Müller and Rinas 1999]

Lösung	Komponente / Konzentration
50 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPP)	0,50 M Na_2HPO_4 : 57,70 mL 0,50 M NaH_2PO_4 : 42,30 mL auf 1 L auffüllen, pH 7
Triton-Waschpuffer	0,50 mM EDTA 20,00 mM Tris 2,00 % Triton X-100 pH 8,5

Nach der Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert, in einem definierten Volumen Natriumphosphat-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Proben des Induktionsverlaufes:

Das erwünschte NaPP-Volumen lag zwischen 500 μL und 800 μL in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß. Die Anzahl der zu addierenden Pellets der 1 mL-Proben (Kapitel 3.1.4.1), die für eine gewünschte optische Dichte bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ von 5 benötigt wurden, sind so gewählt worden, dass 800 μL NaPP-Volumen nicht überschritten wurden.

Aufgeschlossen wurden die Proben mit einem Ultraschallgerät; dazu wurden die Proben konstant je 2 min bei 50 W unter Eiskühlung den Ultraschallwellen ausgesetzt.

Aufschluss der Zellmasse der 10 L-Kultur:

Bei der 10 L-Kultur betrug die gewünschte $\text{OD}_{\lambda 600}$ für den Zellaufschluss 200, woraus dann das NaPP-Volumen und die einzusetzende Zellmasse berechnet werden konnte.

Die Proben wurden fünfmal konstant 1 – 1,5 min bei 300 W unter Eiskühlung aufgeschlossen.

3.2.2 Isolierung der Inclusion Bodies

Nach dem Zellaufschluss wurde eine Probe „Totalprotein“ (TP) für die Gelelektrophorese abgenommen. Eine weitere Probe wurde abzentrifugiert (30 min, 22000 rpm, 4 °C) und vom Überstand eine Probe für „lösliche Proteine“ abgenommen.

Die aufgeschlossene Zellmasse wurde ebenfalls abzentrifugiert (30 min, 5850 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in der Hälfte des Ausgangsvolumens des Natriumphosphat-Puffers resuspendiert und wieder zentrifugiert. Die unlöslichen Proteine wurden anschließend drei- bis viermal in Triton-Waschpuffer von anderen löslichen Zellbestandteilen gereinigt und zentrifugiert, wobei der Überstand jedes Mal entfernt wurde.

Anschließend wurde das Pellet in einem Viertel des Natriumphosphat-Pufferanfangsvolumens resuspendiert und eine Probe „gewaschene Inclusion Bodies“ (IB) wurde abgenommen und eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt (BCA, Kapitel 3.5.4). Die Inclusion Bodies wurden aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

3.2.3 Proteinausfällung (TCA-Fällung)

Trichloressigsäure ist eine starke Säure, die die Proteine denaturiert. Dabei wird die Tertiärstruktur des Proteins zerstört, die Wasserlöslichkeit herabgesetzt und Aggregate gebildet, die dann irreversibel ausfallen.

Die vorhandenen Proteinkonzentration in den Lösungen waren zu niedrig, um sie in der Gelelektrophorese zu detektieren, so dass die Proteine ausgefällt und aufkonzentriert werden mussten.

Tabelle 3.5: TCA-Protein-Fällung [modifiziert nach Bensadoun and Weinstein 1976]

Komponente	Konzentration [g/L]
Deoxycholat	20,00
20 %-ige (w/v) TCA	200,00
Aceton	p.A.

Alle Arbeitsschritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt.

Zunächst wurden 10 µL Deoxycholat-Lösung in 1 mL Proteinlösung gegeben und 10 min stehen gelassen. Anschließend wurden 426 µL 20 %-ige TCA-Lösung dazupipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (15 min, 22000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. 340 µL Aceton wurden auf das Pellet pipettiert und sofort wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Restaceton verdunstete. Die ausgefällten Proteine wurden dann wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben behandelt.

3.3 Analytik

3.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese bewegen sich geladene Moleküle (Proteine, Nukleinsäuren) mittels eines elektrischen Feldes durch eine Matrix mit definierter Porengröße (Polyacrylamid, Agarose). Sie wandern je nach Größe, Ladung oder Struktur der Moleküle unterschiedlich schnell durch die Matrix.

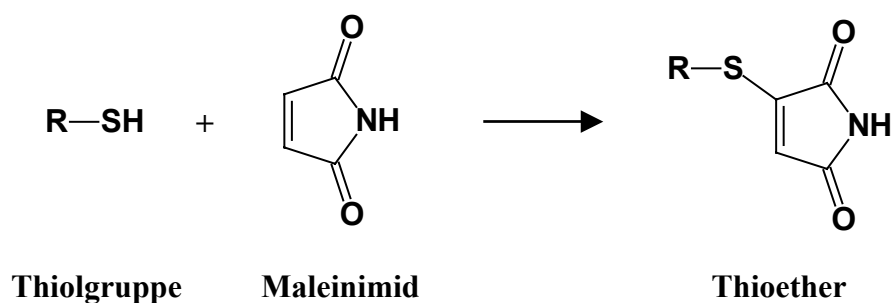
3.3.1.1 Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Tabelle 3.6: Puffer für die Probenvorbereitung

Lösung	Komponente / Konzentration
Probenpuffer	7,00 % (w/v) SDS 0,25 M Tris pH 6,8 34,80 % (v/v) Glycerin 300 µL 0,50 %-ige Bromphenolblau-Lösung/ 100 mL Probenpuffer unter reduzierenden Bedingungen (Probenpuffer + DTT): DTT hinzufügen, Endkonzentration: 0,13 M
SDS-Lösung	20,00 % (w/v) SDS
Maleinimid-Lösung	0,20 M Maleinimid

Die Proben wurden entweder mit reinem Probenpuffer oder unter reduzierenden Bedingungen mit Probenpuffer + DTT versetzt, wobei der Verdünnungsfaktor von der Proteinkonzentration abhängig war. Anschließend wurden sie für 10 min bei 95 °C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen.

Um klare Banden zu erhalten, wurden die Proben/rML-Standard mit Maleinimid behandelt, wobei die freien Thiole blockiert wurden. Dazu wurden 50 % (v/v) Probe (ausgefällte Proteine in PBS aufgenommen)/rML-Standard (2,5-20 µg/mL) mit 10 % (v/v) Maleinimid-Lösung vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 6,5 % (v/v) SDS-Lösung dazupipettiert, mit Probenpuffer auf 100 % (v/v) aufgefüllt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Zeigten die Proben eine Gelbfärbung (zu niedriger pH-Wert), so sind ca. 1 µL 1 M Natronlauge zu den Proben gegeben worden, bis eine Blaufärbung eintrat.

**Abbildung 3.1: Alkylierung von —SH-Gruppen durch Maleinimid**

3.3.1.2 Gradienten-SDS-PAGE

Für die Analytik wurden die 8 – 16 %-igen und 4 – 20 %-igen Tris-HCl CriterionTM Precast Gele von Bio-Rad (Kalifornien, USA) verwendet. Durch den gegebenen ansteigenden Polymerisationsgrad der Gele ist das Auftrennungsspektrum von Proteinen erweitert und es ergeben sich schärfere Banden.

Tabelle 3.7: Laufpuffer der CriterionTM Gele

Lösung	Komponente / Konzentration
Criterion TM -Laufpuffer Stammlösung (10 x)	145,30 g/L Glycin 10,00 g/L SDS 30,00 g/L Tris 1:10 verdünnt einzusetzen

Von den CriterionTM-Fertiggelen wurde der Kamm und Klebestreifen entfernt. Die Gele wurden dann in die Elektrophoresekammer gesteckt und die Anoden- und Kathodenkammer mit CriterionTM-Laufpuffer befüllt. Maximal 15 µL Probe und 5 µL Low-Molecular-Weight-Marker/prestained Marker wurden zur Beladung der Gele eingesetzt. Die Gelkammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen und für ca. 1 h auf 200 V eingestellt.

3.3.1.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

In der diskontinuierlichen Gelelektrophorese [beschrieben in Laemmli 1970] entsteht im Sammelgel (pH 6,8) ein Spannungsabfall, wodurch sich die Proteine relativ schnell im elektrischen Feld bewegen und am Trenngel (pH 8,8) durch den pH-Wertsprung und die geringere Porengröße angesammelt werden. Die Proteine werden in einer scharfen Bande konzentriert.

Tabelle 3.8: Lösungen für die SDS-PAGE-Gelherstellung (1 mm Dicke)

Lösung	Komponente / Konzentration
Lower-Puffer	1,50 M Tris 0,40 % (w/v) SDS pH 8,8
Upper-Puffer	0,50 M Tris 0,40 % (w/v) SDS pH 6,8
Laufpuffer-Stammlösung (10x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1,50 % (w/v) SDS pH 8,6 1:10 verdünnt einzusetzen
APS	40,00 % (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
Acrylamid-Lösung	Rotiphorese® Gel 30

12,5 %-iges Trenngel:

Acrylamid-Lösung	6,25 mL
Lower-Puffer	3,80 mL
Milli-Q-H ₂ O	2,45 mL
Glycerin 87 %	2,50 mL
TEMED	12 µL
40 %-ige APS	18 µL

3 %-iges Sammelgel:

Acrylamid-Lösung	0,50 mL
Upper-Puffer	1,25 mL
Milli-Q-H ₂ O	3,20 mL
TEMED	12 µL
40 %-ige APS	18 µL

Das Trenngel wurde mit Milli-Q-Wasser überschichtet und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde das Wasser vollständig entfernt, das Sammelgel luftblasenfrei darauf pipettiert und ein Probenkamm (Kamm mit 12 Taschen) hineingesteckt, der nach der Polymerisierung aus dem Gel gezogen wurde. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt, Laufpuffer eingefüllt, mit den Proben/Standard beladen (20 μ L Probenvolumen) und an die Spannungsquelle angeschlossen. Diese wurde 15 min auf 10 mA/Gel und ca. 70 min auf 25 mA/Gel eingestellt.

3.3.2 Proteinfärbemethoden

3.3.2.1 Coomassie®-Färbung

Die Coomassie®-Färbung ist die am häufigsten verwendete Proteinfärbemethode. Die Sensitivität des Coomassie®-Brilliantblau R 250 liegt bei ca. 200 ng/Bande [Rehm 2002]. Es lagert sich an den basischen Seitenketten der Aminosäuren an.

Tabelle 3.9: Coomassie®-Färbung

Lösung	Komponente / Konzentration
Fixierlösung	40,00 % (v/v) Ethanol 10,00 % (v/v) Essigsäure
Coomassie®-Färbelösung	1,16 g Coomassie®-Brilliantblau R 250/L Entfärbelösung vor Gebrauch auf ca. 70 °C zu erwärmen
Entfärbelösung	25,00 % (v/v) Ethanol 8,00 % (v/v) Essigsäure

Die Gele wurden mindestens 20 min in der Fixierlösung auf einem Schüttler fixiert, was ein Ausfällen der Proteine verursacht und so diese nicht aus dem Gel diffundieren können. Anschließend wurden die Gele mit erwärmter Coomassie®-Färbelösung 20 – 30 min lang gefärbt. Darauf folgend wurde ca. 2 h der Hintergrund entfärbt, so dass nur noch die Banden zu erkennen waren.

3.3.2.2 Colloidale Coomassie®-Färbung

Die Färbung mit colloidalem Coomassie®-G 250 ist wesentlich sensitiver als die einfache Coomassie®-Färbung (~ 20 ng/Bande).

Tabelle 3.10: Lösungen für eine colloidale Coomassie-Färbung

[Herstellerangaben, Sigma-Aldrich, angegebene Referenz: Neuhoﬀ et al. 1988]

Lösung	Komponente / Konzentration
Fixierlösung	7,00 % (v/v) Essigsäure 40,00 % (v/v) Methanol
Färbelösung	80,00 % (v/v) Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate 20,00 % (v/v) Methanol
Entfärbelösung 1	10,00 % (v/v) Essigsäure 25,00 % (v/v) Methanol
Entfärbelösung 2	25,00 % (v/v) Methanol

Die Gele wurden 1 h fixiert. Die Färbelösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt und die Gele über Nacht gefärbt. Die Gele wurden ca. 30 s in der Entfärbelösung 1 geschwenkt, kurz mit Entfärbelösung 2 gespült, und dann ca. 4 h lang in Entfärbelösung 2 der Hintergrund entfärbt.

Coomassie®-Brilliantblau G 250 als auch das in der Coomassie®-Färbemethode verwendete Coomassie®-Brilliantblau R 250 können zur Quantifizierung eingesetzt werden.

Die Gele wurden dazu eingescannt. Die Proteinkonzentrationen konnten durch das Softwareprogramm QuantiScan Version 2.1 (BIOSOFT®, Großbritannien) ermittelt werden. Zur Erhaltung der Gele wurden diese zwischen zwei GelAir-Folien getrocknet und feuchtigkeitsgeschützt aufbewahrt.

3.3.2.3 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung lagern sich die Ag^+ -Ionen an den Proteinen (Glu-, Asp- und Cys-Reste) an und werden durch Zugabe von alkalischen Formaldehyd zu elementaren Ag reduziert.

Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit (5 ng/Bande [Rehm 2002]), jedoch lassen sich die Ergebnisse weder reproduzieren noch quantifizieren, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden. Die Silberfärbung ist außerdem nicht spezifisch. Es werden neben Proteinen auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide angefärbt.

Die Silberfärbung wurde mit einer modifizierten Methoden nach Blum et al. 1987 durchgeführt.

Tabelle 3.11: Silberfärbung

Lösung	Komponente / Konzentration
Fixierlösung	40,00 % (v/v) Ethanol 10,00 % (v/v) Essigsäure
Waschlösung	30,00 % (v/v) Ethanol
Thiosulfat-Lösung	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Silbernitrat-Lösung	0,20 % (w/v) Silbernitrat
Entwicklerlösung	3,00 % (w/v) Natriumcarbonat 0,05 % (v/v) Formaldehyd-Lösung (37 %) 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat
Stopplösung	0,50 % (w/v) Glycin

Die Gele wurden mindestens 2 h auf einem Schüttler fixiert. Die fixierten Gele wurden dreimal 20 min in Waschlösung geschwenkt und dann 1 min mit Thiosulfat-Lösung behandelt. Anschließend sind sie dreimal 20 s mit Milli-Q-Wasser gespült und 20 min in Silbernitrat-Lösung geschüttelt worden. Die Gele wurden zweimal 20 s mit Milli-Q-Wasser gespült und ca. 5 – 10 min je nach Intensität in Entwicklerlösung gefärbt.

Zweimal wurde 1 min mit Milli-Q-Wasser gespült; dabei musste beachtet werden, dass die Entwicklung noch nicht abgeschlossen war. Die Reaktion wurde mit der Stopplösung beendet, indem man die Gele 5 min in dieser schwenkte. Anschließend wurden die entwickelten Gele 30 min in Milli-Q-Wasser geschüttelt.

3.3.3 Western Blot

Der Western Blot mit anschließender Immunfärbung wird zum Nachweis eines bestimmten Proteins in einem Gemisch durch einen spezifischen Antikörper eingesetzt. Durch die

Verwendung eines markierten Antikörpers, der an diesen bindet, erhöht sich die Nachweissensitivität, bei der auch Proteinmengen im Pikogrammbereich nachgewiesen werden können.

3.3.3.1 Semidry-Blot [modifiziert nach Kyhse-Andersen 1984]

Tabelle 3.12: Semidry-Blot

Lösung	Komponente / Konzentration
Transferpuffer	48,00 mM Tris 39 mM Glycin 0,0375 % (w/v) SDS 20,00 % (v/v) Methanol
Methanol	p.A.

Wie in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, wurden SDS-Gele hergestellt und mit den Proben sowie einem vorgefärbten Marker als Transferkontrolle beladen. Die Tris-HCl CriterionTM Precast Gele (3.3.1.2) eigneten sich nicht so gut für den Western Blot. Die Proteine waren stärker in der Gelmatrix gebunden und wurden teilweise nicht vollständig auf die Membran übertragen.

Für den Western Blot mussten vier Filterpapiere in Gelgröße sowie eine Blotting-Membran (PVDF [Gültekin and Heermann 1988]) zurechtgeschnitten werden. Die Filterpapiere wurden 20 min vor Gellaufende in den Transferpuffer gelegt. Die Membran wurde kurz vorher ein paar Sekunden in Methanol getränkt und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Zwei der Filter wurden durch Ausdrücken von überschüssigem Puffer befreit und auf die Anode der Blotting-Kammer gelegt. Die Membran wurde nun darauf luftblasenfrei ausgebreitet.

Das Gel wurde kurz im Transferpuffer äquilibriert und anschließend luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Die anderen beiden Filterpapiere wurden auf das Gel platziert und die Kammer fest verschlossen.

Die Spannungsquelle wurde langsam auf 15 V eingestellt. Dabei wurden 350 mA nicht überschritten, um das System nicht zu überhitzen. Der Blotting-Vorgang wurde über 1 - 2 h durchgeführt. Der Transfer galt als abgeschlossen, wenn sich der vorgefärbte Marker komplett auf der Membran befand. Das Gel wurde zur Kontrolle mit Coomassie[®] gefärbt und die Membran zur Immunfärbung vorbereitet.

3.3.3.2 Immunfärbung

Tabelle 3.13: Immunfärbung

Lösung	Komponente / Konzentration
8,5 %-ige NaCl-Lösung (Stammlösung 10x)	85,00 g/L NaCl 1:10 verdünnt einzusetzen
Färbepuffer	100,00 mM Tris 100,00 mM NaCl 50,00 mM MgCl ₂ • 6 H ₂ O pH 9,5
Stopppuffer	20,00 mM Tris 0,50 mM EDTA
Tris-Puffer	100,00 mM Tris
Nitrotetrazoliumchloridblau-Lösung	100,00 mg Nitrotetrazoliumchloridblau in 1,33 mL 70,00 % Dimethylformamid
BCIP-Lösung	50,00 mg BCIP in 1,00 mL Dimethylformamid
Magermilchpuffer	10,00 % (v/v) 0,10 M Tris-Puffer 10,00 % (v/v) 8,50 % NaCl-Lösung 2,00 % (v/v) Triton-X 100 5,00 % (w/v) Magermilchpulver
Färbelösung	10,00 mL Färbepuffer 44 µL Nitrotetrazoliumchloridblau-Lösung 33 µL 5-BCIP-Lösung
spezifische Antikörper	TA5 gegen rMLA TB33 oder 2.3.1 B gegen rMLB Alkalische Phosphatase (Anti-Maus IgG)-IgG aus Ziege

Die Membran wurde dreimal 5 min in 0,85 %-ige NaCl-Lösung bei Raumtemperatur geschwenkt und über Nacht in Magermilchpuffer bei 4 °C abgesättigt. Der Magermilchpuffer wurde dekantiert und neuer Puffer mit spezifischem Antikörper (Verdünnung abhängig vom Antikörper, siehe Tabelle 7.1; Anhang) 2 – 4 h bei Raumtemperatur unter

Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran siebenmal 5 min mit 0,85 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und erneut in Magermilchpuffer für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt, in dem später die Alkalische Phosphatase (detektierbares Signal mit 20 – 50 pg [Mierendorf et al. 1987]) verdünnt und für 2 h inkubiert wurde. Die Membran wurde nach Inkubation fünfmal 5 min in 0,85 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und danach zweimal 5 min in Färbepuffer geschüttelt und abgegossen. Die kurz zuvor angesetzte Färbelösung gab man auf die Membran und unter Beobachtung wurde bis zur erwünschten Intensität der Banden gefärbt. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von Stopppuffer beendet. Anschließend wurde die Membran auf einem Filter bei Raumtemperatur getrocknet und in Dunkelheit aufbewahrt.

3.3.4 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay und Enzyme-Linked-Lectin-Assay

Für die Analytik mittels ELISA und ELLA musste der Rückfaltungspuffer ausgetauscht werden (Kapitel 4.2.2). Mittels Ultrafiltration wurde der Puffer durch PBS ersetzt.

3.3.4.1 Austausch des Puffersystems

Tabelle 3.14: Lösungen der Umpufferung

Lösung	Komponente /Konzentration
Absättigungspuffer	20,00 mM Tris 85,50 mM NaCl 1,00 mM EDTA 5,00 % (v/v) Tween 20 pH 8
Phosphatpufferlösung (PBS) Stammlösung (10 x)	200,00 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 40,00 mM NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O 1,28 mM NaCl pH 7,4 1:10 verdünnt einzusetzen

Um die Proteine in ein anderes Puffersystem zu überführen, wurden verschiedene Ultrafiltrationseinheiten von Vivascience (Großbritannien) und Millipore (Massachusetts, USA) mit verschiedenen Membranen (PES, RC und CTA), Porengrößen und Volumina

ausgetestet. Die besten Ergebnisse lieferten die Ultrafiltrationseinheiten Amicon[®] Ultra-4 von Millipore.

Da die rMLB-Ketten eine hohe Affinität zu verschiedenen Membranen aufweisen, wurden die Filtermembranen abgesättigt. Dazu wurde Absättigungspuffer in die Ultrafiltrationseinheiten gegeben, so dass die Membran vollständig benetzt war, und mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert. Der Puffer wurde abzentrifugiert, die Ultrafiltrationseinheiten einmal mit gleichem Volumen Milli-Q-Wasser zentrifugiert und anschließend mit Milli-Q-Wasser kurz gespült.

Die Ultrafiltrationseinheiten wurden nach Vorschrift gehandhabt. Die abzentrifugierten Proteine (Pufferendvolumen betrug ca. 50 µL) wurden in gleichen Volumina PBS aufgenommen.

Bevor die Proben vermessen wurden, sind diese nach dem Umpuffern bei -70 °C eingefroren worden.

3.3.4.2 ELISA

Das korrekt gefaltete Dimer rML kann durch einen ELISA, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, quantitativ bestimmt werden.

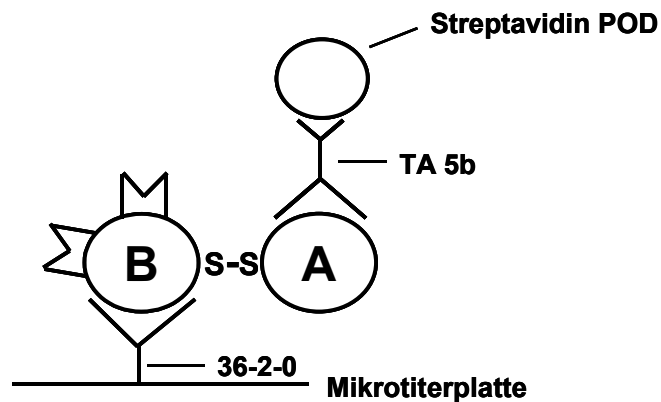


Abbildung 3.2: Spezifische Gehaltsbestimmung von rML

A: rMLA-Kette; B: rMLB-Kette; S-S: Disulfidbindung; 36-2-0: monoklonaler Antikörper gegen rMLB; TA 5b: biotinylierter, monoklonaler Antikörper gegen rMLA, an den Streptavidin-Peroxidase bindet.

Tabelle 3.15: ELISA

Lösung	Komponente / Konzentration
Carbonatpuffer	40,00 mM Na ₂ CO ₃ 60,00 mM NaHCO ₃ pH 9,6
Phosphatpufferlösung (PBS) Stammlösung (10 x)	200,00 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 40,00 mM NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O 1,28 mM NaCl pH 7,4; 1:10 verdünnt einzusetzen
PBS-T(Probenpuffer)	1 x PBS 0,01 % (v/v) Tween 20
PBS-T(Waschlösung)	1 x PBS 0,10 % (v/v) Tween 20
PBS-T-1% BSA	PBS-T(Probenpuffer) 1,00 % (w/v) BSA
PBS-T-0,1% BSA	PBS-T(Probenpuffer) 0,10 % (w/v) BSA
20 %-ige Schwefelsäure	20,00 % (v/v) einer 95 – 97 % -igen Schwefelsäure
spezifische Antikörper	36-2-0 mAK (Fangantikörper) TA5b (Verdünnungen, Tabelle 7.1; Anhang)
Streptavidin-Peroxidase	Streptavidin-Peroxidase aus <i>Streptomyces avidinii</i> , Stammlösung: 100 µg in 100 µL H ₂ O, 1:50 in 1 x PBS verdünnt
Färbelösung	TMB

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden 100 µL einer Lösung aus dem Fangantikörper in Carbonatpuffer (65,5 µL 36-2-0 in 10,5 mL Carbonatpuffer) in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach ungefähr 16 h wurden die Wells dreimal mit je 150 µL PBS-T(Waschlösung) in einem Mikrotiterplattenwascher gewaschen. Zum Absättigen der Platte wurde anschließend 1 h mit je

200 µL PBS-T-1% BSA bei 37 °C inkubiert. Die Wells wurden erneut dreimal mit je 150 µL PBS-T(Waschlösung) gewaschen. Die beschichteten Mikrotiterplatten sind bei Bedarf bei –18 °C ca. 3 Monate lagerfähig.

Standard-/Probenvorbereitung:

Der Standard rML 01-W1040 (Ch.-B.: 970303; 223 µg/mL) (erhalten von der QC/BVT der GBF)* wurde 1:100 verdünnt (10 µL + 990 µL PBS-T(Probenpuffer)). 89,7 µL der Vorverdünnung wurden mit PBS-T(Probenpuffer) auf 2 mL aufgefüllt (\cong 100 ng/mL).

Tabelle 3.16: Standardverdünnung

Sollkonzentration (ng/mL)	PBS-T(Probenpuffer) (µL)	Referenzlösung (µL)	Wells
Blank	Blank	Blank	A 1-3
5,00	380,00	20,00	B 1-3
10,00	360,00	40,00	C 1-3
20,00	320,00	80,00	D 1-3
40,00	240,00	160,00	E 1-3
60,00	160,00	240,00	F 1-3
80,00	80,00	320,00	G 1-3
100,00	0,00	400,00	H 1-3

Die Proben wurden mit PBS-T(Probenpuffer) verdünnt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

100 µL des/der Standards/Proben wurden pro Well pipettiert, abgedeckt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Wells dreimal mit je 150 µL PBS-T(Waschlösung) gewaschen und mit 100 µL TA5b-Antikörper-Lösung (verdünnt in PBS-T-0,1% BSA) befüllt, abgedeckt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Wells wurden danach erneut gewaschen und 100 µL Streptavidin-Peroxidase-Lösung (1:220 in PBS-T-0,1% BSA verdünnt) hineinpipettiert. Die Platte wurde abgedeckt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschgang wurden 100 µL TMB-One-Substrat pro Well gegeben und für 30 – 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei sich rML-haltige Proben blau färbten. Die Reaktion wurde mit 100 µL 20 %-iger Schwefelsäure pro Well

* Qualitätssicherung des Bereiches Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Deutschland (heutige Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig)

abgestoppt, worauf eine Gelbfärbung entstand, die im Mikrotiterplattenreader detektiert wurde. Die Extinktion musste innerhalb einer Stunde bei 450 nm gemessen werden. Die Auswertung wurde mit der Software SOFTmax[®]PRO Version 3.1.2 (Molecular Devices Corp., USA) durchgeführt.

3.3.4.3 ELLA

Mit dem ELLA kann der Gehalt des korrekt gefalteten Dimers rML über die galaktosid-spezifische Bindung bestimmt werden.

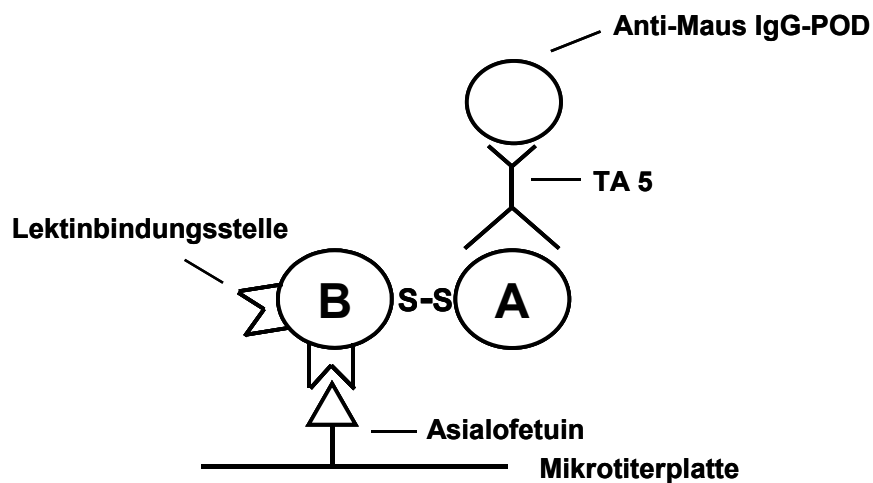


Abbildung 3.3: Bestimmung der galaktosidspezifischen Bindung des rML

Spezifischer Test zur Überprüfung auf Moleküle, die aktive Lektinbindungsstellen enthalten und in dimerer Struktur vorliegen; A: rMLA-Kette; B: rMLB-Kette; S-S: Disulfidbindung; monoklonaler Antikörper gegen rMLA, an den ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper bindet.

Tabelle 3.17: ELLA

Lösung	Komponente / Konzentration
Phosphatpufferlösung (PBS) Stammlösung (10 x)	200,00 mM Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O 40,00 mM NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O 1,28 mM NaCl pH 7,4 1:10 verdünnt einzusetzen
PBS-T(Probenpuffer)	1 x PBS 0,01 % (v/v) Tween 20

Fortsetzung Tabelle 3.17: ELLA

Lösung	Komponente / Konzentration
PBS-T(Waschlösung)	1 x PBS 0,10 % (v/v) Tween 20
PBS-T-1% BSA	PBS-T(Probenpuffer) 1,00 % (w/v) BSA
PBS-0,05% BSA	1 x PBS 0,05 % (w/v) BSA pH 7,4
PBS-T-0,10% BSA-Tx	PBS-T(Probenpuffer) 0,10 % (w/v) BSA 1 % (v/v) Triton X-100
20 %-ige Schwefelsäure	20,00 % (v/v) einer 95 – 97 % -igen Schwefelsäure
Beschichtungslösung	1 x PBS 10 % (w/v) Asialofetuin
spezifische Antikörper	TA5 (Verdünnung, Tabelle 7.1; Anhang) Anti-Maus-IgG-Peroxidase
Färbelösung	TMB

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten wurden 100 µL der Beschichtungslösung in jedes Well pipettiert. Die Platten wurden abgedeckt über Nacht (mind. 16 h, max. 72 h) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden danach mit 150 µL PBS-T(Waschlösung) dreimal gewaschen und anschließend zum Absättigen mit 200 µL PBS-T-1% BSA gefüllt. Die Platten wurden 60 min bei 37 °C inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Die beschichteten Mikrotiterplatten sind bei Bedarf bei –18 °C ca. 8 Wochen lagerfähig.

Standard-/Probenvorbereitung:

Der Standard rML 01-W1040 (Ch.-B.: 970303; 223 µg/mL) (erhalten von der QC/BVT der GBF)* wurde 1:100 verdünnt (10 µL + 990 µL PBS-0,05% BSA). 224,22 µL der Vorverdünnung wurden mit PBS-0,05% BSA auf 2 mL aufgefüllt (\cong 250 ng/mL).

* Qualitätssicherung des Bereiches Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Deutschland (heutige Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig)

Tabelle 3.18: Standardverdünnung

Sollkonzentration (ng/mL)	PBS-0,05% BSA (µL)	Referenzlösung (µL)	Wells
Blank	Blank	Blank	A 1-3
10,00	336,00	14,00	B 1-3
20,00	322,00	28,00	C 1-3
50,00	280,00	70,00	D 1-3
100,00	210,00	140,00	E 1-3
150,00	140,00	210,00	F 1-3
200,00	70,00	280,00	G 1-3
250,00	0,00	300,00	H 1-3

Die Proben wurden mit PBS-0,05% BSA verdünnt und jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. In jedes Well wurden 100 µL Probe gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden nach ca. 16 h dreimal gewaschen und die Wells mit 100 µL TA5-Antikörper-Lösung befüllt 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 µL Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Lösung einpipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde 100 µL TMB-Substrat in die Wells gegeben und für 15 min bei 37 °C im Dunkeln aufbewahrt. Dabei entstand eine starke Blaufärbung. Die Reaktion wurde durch 100 µL 20 %-ige Schwefelsäure abgestoppt. Die entstandene Gelbfärbung wurde innerhalb einer Stunde bei 450 nm vermessen. Die Auswertung wurde mit der Software SOFTmax[®] PRO Version 3.1.2 (Molecular Devices Corp., Kalifornien, USA) durchgeführt.

3.3.5 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay

Der Assay basiert auf einer Komplexbildung zwischen Cu⁺-Ionen und Bicinchonininsäure. Dabei werden zunächst Cu²⁺-Ionen in alkalischer Umgebung zu Cu⁺-Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). Anschließend bilden zwei Bicinchonininsäuremoleküle mit einem Cu⁺-Ion einen violetten Farbkomplex, der bei 562 nm detektiert werden kann. Die Farbintensität verhält sich linear zur ansteigenden Proteinkonzentration [Smith et al. 1985].

Tabelle 3.19: Lösungen für den BCA Protein Assay

Lösung	Komponente / Konzentration
BCA Protein Assay	-
Solubilisierungspuffer	6,00 M Gnd-HCl 0,05 M Tris 0,10 M DTT pH 8
SDS-Puffer	0,10 M Tris 8,00 % (w/v) SDS pH 8,6 Puffer 1: SDS-Puffer 1:8 verdünnt Puffer 2: SDS-Puffer 1:16 verdünnt
Protein-Standardlösung	BSA (43,75 µg/mL - 700,00 µg/mL)

Die Proteinbestimmung wurde mittels BCA Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Da die Messung nicht mit den vorhandenen Puffern vollzogen werden konnte, wurden die gelösten Inclusion Bodies/Proteine zunächst mit Wasser/TCA gefällt und in einem SDS-Puffer aufgenommen (für die Löslichkeit der Proteine durfte die Gnd-HCl-Konzentration nicht unter 4 M sein).

Ausfällen der Inclusion Bodies:

30 µL gelöste Inclusion Bodies (ca. 100 mg Feuchtmasse/mL) wurden mit 30 µL des gleichen Solubilisierungspuffers, mit dem die Inclusion Bodies gelöst wurden, vermischt und zu 1740 µL Milli-Q-Wasser gegeben. Dieses Gemisch wurde 5 min bei 4 °C stehen gelassen und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag mit 120 µL SDS-Puffer versetzt und bei 95 °C in Lösung gebracht. Das Kondenswasser wurde durch Anzentrifugieren der Proteinlösung wieder zugeführt. Die gelösten Proben wurden 1:16, 1:32 und 1:48 verdünnt.

Standardlösung:

1,4 mg BSA/mL Milli-Q-Wasser wurden mit Puffer 1 1:2 verdünnt, dieses entspricht 700 µg BSA/mL. Die weiteren Verdünnungen gingen von dieser 700 µg-Lösung aus und wurden mit Puffer 2 durchgeführt:

Tabelle 3.20: BSA-Standardreihe (für 100µL)

Konzentration [µg/mL]	Verdünnung	700 µg-Lösung [µL]	Puffer 2 [µL]
43,75	1:16	6,25	93,75
87,50	1:8	12,50	87,50
175,00	1:4	25,00	75,00
233,33	1:3	33,33	66,67
350,00	1:2	50,00	50,00
466,66	1:1,5	66,67	33,33

3.3.6 Massenspektrometrie

Proteine werden mittels „matrix-assisted-laser-desorption-ionization“ (MALDI) mit „time of flight“ (TOF, Vakuum-Flugröhre) vermessen. Dabei werden die Proteine in UV-absorbierende Moleküle (Matrix) eingebaut, die auf die Proteine Protonen übertragen und sie so positiv laden. Im Hochvakuum werden sie mit einem UV-Laser Puls bestrahlt. Hierbei werden die Matrix und damit die Proteine explosionsartig gasförmig und ionisiert. Die Proteinionen werden durch ein elektrisches Feld auf einen Schlitz zu beschleunigt und erreichen den Detektor nach Passieren des TOF zu verschiedenen Zeiten auf Grund unterschiedlicher Masse und Ladung [Rehm 2002].

Tabelle 3.21: Lösung für die Probenvorbereitung für MALDI-TOF

Lösung	Komponente / Konzentration
Acetonitril	p.A.
Ammoniumhydrogencarbonat	0,1 M und 25 mM NH ₄ HCO ₃

Fortsetzung Tabelle 3.21 Lösung für die Probenvorbereitung für MALDI-TOF

Lösung	Komponente / Konzentration
Verdaulösung	2 µg/mL Trypsin 20 µg in 100 µL mitgelieferten Puffer (50 mM NH ₄ HCO ₃ (pH 7,8), 15 min bei 37 °C, auf 10 mL mit 50 mM NH ₄ HCO ₃) aliquotiert bei –20 °C lagern
Ameisensäure	5 % (v/v) Ameisensäure
Waschlösung 1	0,5 % (v/v) Ameisensäure, 65 % (v/v) Methanol
Äquilibrierlösung/ Waschlösung 2	0,5 % (v/v) Ameisensäure, 5 % (v/v) Methanol
Matrixlösung	Cyanozimtsäure in Waschlösung 1, gesättigte Lösung abzentrifugieren

Die SDS-Gele wurden mit Milli-Q-Wasser gewaschen, die zu untersuchenden Banden eng ausgeschnitten und als 1 mm³ große Stücke in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Stücke wurden in 200 µL Milli-Q-Wasser 5 min gewaschen und der Überstand anschließend verworfen. Etwa das 3 – 4 fache Gelvolumen Acetonitril wurde zugegeben, 10 – 15 min stehen gelassen, kurz anzentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Gelstückchen wurden in einem Vakuumkonzentrator getrocknet.

Um die Coomassie®-Blaufärbung zu entfernen, wurden die Stücke mit 150 µL 0,1 M NH₄HCO₃ versetzt, nach 10 min 150 µL Acetonitril zugegeben und 20 min geschüttelt, anschließend kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit 50 µL Acetonitril wurden die Stücke dehydratisiert, dabei kleben die Stückchen zusammen. Nach kurzen Zentrifugieren wurde das Acetonitril vollständig entfernt und die Stückchen in dem Vakuumkonzentrator getrocknet.

Trypsin spaltet regioselektiv Peptidbindungen hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin. Mit der Verdaulösung wurden die Gelstückchen überschichtet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 15 µL 25 mM NH₄HCO₃ hinzugefügt und bei 37 °C 15 min geschüttelt. Anschließend wurden 50 µL Acetonitril hinzugegeben und weitere 15 min geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und gesammelt. Zu den Stückchen wurden 50 µL 5 %-ige Ameisensäure zugefügt und erneut

bei 37 °C geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand zu dem zuvor gesammelten addiert. Der gesammelte Überstand wurde in dem Vakuumkonzentrator auf ca. 20 µL eingengt. Eine MALDI-Probenplatte wurde mit Ethanol gereinigt und für jede Probe Gefäße mit Wasch- und Äquilibrierlösungen bereitgestellt. Das Zip Tip_{C18}TM-Säulenmaterial wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Waschlösung 1 gewaschen und anschließend mit Äquilibrierlösung behandelt. Die Proteinlösung wurde fünfzehnmal aufgezogen und das Säulenmaterial danach langsam zwei- dreimal mit Waschlösung 2 gespült. Die Proteine sind dann durch die Elution mittels der Matrixlösung (1 µL) direkt auf die Probenplatte pipettiert worden. Bei allen Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass keine Luft eingezogen wurde. Die Proben wurden zum Vermessen durch MALDI-TOF zur Abteilung Biophysikalische Analytik des Bereiches Strukturbioogie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (Deutschland)* gegeben, wo auch die Daten mit dem Softwareprogramm flexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics GmbH, Deutschland) bearbeitet wurden. Mittels MASCOT 2.1.0 (Matrix Science Ltd., Großbritannien) und Vergleich mit der NCBI-BLAST2-Protein-Datenbank** wurden die Daten anschließend ausgewertet.

3.4 Rückfaltung

3.4.1 Solubilisierung

Tabelle 3.22: Puffer zur Solubilisierung

Lösung	Komponenten / Konzentrationen
Solubilisierungspuffer	6,00 M Gnd-HCl 50,00 mM Tris 100,00 mM DTT pH 8
Verdünnungspuffer	6,00 M Gnd-HCl 50,00 mM Tris pH 6

* Abteilung Biophysikalische Analytik des Bereiches Strukturbioogie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Deutschland (heutige Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig)

** NCBI-BLAST2-Protein-Datenbank: National Center of Biotechnology Information; Maryland, USA

Die Inclusion Bodies (Konzentration: 20 – 30 mg/mL) wurden 3 h bei 10 °C in einem Thermomixer bei 1200 rpm solubilisiert und abzentrifugiert. Danach wurden die gelösten Inclusion Bodies entweder direkt (Rückfaltungsmethode A) eingesetzt (nacheinander oder gemeinsam) oder je nach erwünschter Konzentration rMLA und rMLB in 6 mL Verdünnungspuffer gegeben (z.B. 10 µg/mL Gesamtmonomerkonzentration entspricht 2,11 mg IB/6 mL Verdünnungspuffer; Rückfaltungsmethode B) und im Anschluss auf verschiedene Weise in die Rückfaltungspuffer verdünnt (Gesamtproteinkonzentrationen: 5 – 80 µg/mL), welches in Kapitel 3.4.2 beschrieben wird.

3.4.2 Rückfaltungssysteme

Die Proteinlöslichkeit wurde im 1 mL-Maßstab in Eppendorf-Reaktionsgefäßen untersucht (temperiert im Thermomixer). In 33 mL-Ansätzen in Schottflaschen (temperiert im Kühlraum und beheizbaren Magnetrührern) und in 200 mL-Ansätzen in einem Infors-Sixfors-System (Schweiz) wurde die Rückfaltung durchgeführt. Das Sixfors-System besteht aus sechs 350 mL-Reaktoren (Schmizo AG, Schweiz) mit Blattrührern, die trocken über Aluminiumbacken mit integrierten Wärmetauschern temperiert werden, die schnelle Temperaturwechsel zulassen. Das Kühlsystem wurde für die Temperierung an einen Kryostat angeschlossen und die Temperatur über Pt-100-Elektroden (Infors, Schweiz) detektiert. Zudem konnten die Reaktoren separat begast werden. Das Redoxpotential wurde mit einer Redoxelektrode Pt 42 A (SCHOTT Instruments, Deutschland) gemessen.

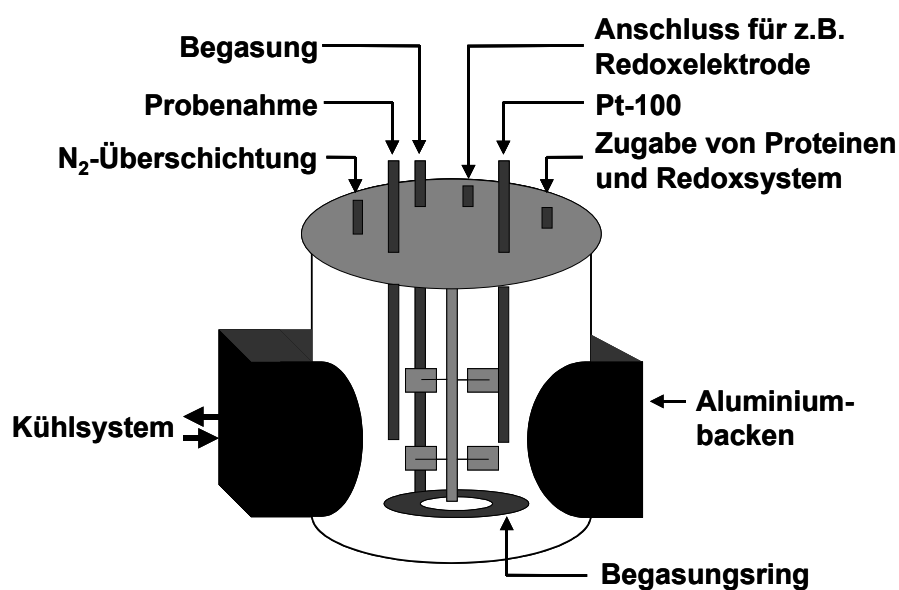


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung eines Sixfors-Reaktors

Tabelle 3.23: Rückfaltungspuffer

Lösung	Komponenten / Konzentrationen
Rückfaltungspuffer I [Vallejo et al. 2002]	50,00 mM Tris 5,00 mM EDTA 1,00 M NaCl 2,00 mM GSSG 4,00 mM GSH 1,00 M CHES pH 8.5
Rückfaltungspuffer II	50,00 mM Natriumphosphatpuffer 50,00 mM KCl 1,00 mM EDTA 100,00 mM Glukose 20,00 mM Laktose 10,00 % (v/v) Glycerin 10,00 mM Cystein 1,00 mM Cystin pH 8
Redoxsysteme	C/C: Cystein/Cystin: 5:1, 7,5:1, 10:1, 15:1, 10:2 Stammlösung: 1,00 M Cystein, pH 7,8 50,00 mM Cystin, pH 11 GSSG/GSH: 1:1, 2:1, 5:1, 40:1 Stammlösung: 300,00 mM GSSG/GSH

Fortsetzung Tabelle 3.23: Rückfaltungspuffer

Variationen des Rückfaltungspuffers I	50,00 mM Tris 5,00 mM EDTA 1,00 M NaCl verschiedene Redoxsysteme anstatt von 1,00 M CHES: 0,00 – 1,00 M CHES 1,00 M CHES mit 2,00 % Triton X-100 oder 0,50 – 1,00 M Arginin oder 1,00 M NA oder 1,00 M PPS oder 1,00 M PSA pH 8
Rückfaltungspuffer III: (abgewandelt nach Rückfaltungspuffer II)	100,00 mM Tris 50,00 mM KCl 1,00 mM EDTA 100,00 mM Glukose 20,00 mM Laktose 10,00 % (v/v) Glycerin 10,00 mM oder 5,00 mM Cystein 1,00 mM Cystin

Die Rückfaltungspuffer wurden bei den 1 mL- und 33 mL-Ansätzen vor Gebrauch mindestens 15 min mit Stickstoff stark und bei den 200 mL-Ansätzen im Sixfors-System über Nacht unter Rühren schwach begast, um den Sauerstoff zu entfernen. Nach der Zugabe des Redoxsystems wurde bei den 200 mL-Ansätzen der Stickstoffanschluss umgesteckt, so dass während des gesamten Prozesses der Stickstoff den Puffer überschichtete. Bei den kleineren Ansätzen wurde zweimal täglich mit Stickstoff überlagert. Das Redoxsystem wurde über Einwegspritzen in den Puffer getropft. Dies geschah bei den großen Ansätzen unter Rühren (50 – 100 rpm), bzw. wurde bei den kleinen Ansätzen nach Zugabe des Redoxsystems der Rückfaltungsansatz geschwenkt. Nach Zugabe des Redoxsystems wurde die Proteinlösung eingetropft/pipettiert. Bei den 200 mL-Rückfaltungsansätzen im Sixfors-System wurden 6 mL Proteinlösung (Rückfaltungsmethode B) kontinuierlich über eine Peristaltik-Pumpe P-1 zehn Stunden lang mit einer Flussrate von 0,6 mL/h zugeführt, direkt als batch-Ansatz die gesamte Proteinlösung oder pulsweise (alle 15 min, 30 min und

1 h) zugegeben. Bei den Optimierungsexperimenten (verschiedene Versuchsbedingungen und Puffersysteme) wurde die Proteinzugabe pulsweise jede Stunde über 10 h in den Rückfaltungspuffer eingetropft.

Zudem wurde bei den 33 mL- (Rührkern, minimale Rührgeschwindigkeit) bzw. 200 mL-Ansätzen (während der Proteinzugabe 50 rpm, danach 10 rpm) kontinuierlich gerührt, das heißt, die Lösung wurde in Bewegung gehalten.

Zusätzlich zur Untersuchung des Rückfaltungsverhaltens bei unterschiedlichen Puffer- und Redoxsystemen bzw. Rückfaltungsmethoden wurden noch die Variablen Temperatur und pH-Wert überprüft.

Um eine optimale Prozesstemperatur zu bestimmen, wurden unter sonst gleichen Bedingungen mehrere Parallelansätze im 200 mL-Maßstab bei 0 °C, 2 °C, 5 °C, 7,5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C und 25 °C durchgeführt. Da mit dem Sixfors-System keine 0 °C und 2 °C erreicht werden konnten, wurden Reaktoren separat in einem doppelwandigen Kühlgefäß temperiert. Für die Untersuchung des Rückfaltungsverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten musste das Puffersystem des Rückfaltungspuffer II ausgetauscht werden (Rückfaltungspuffer III). Es wurde jeweils der Rückfaltungspuffer III mit einem pH-Wert von 6,5, 7,0, 7,5, 8, 8,5, 9 und 10 (bei Raumtemperatur eingestellt) angefertigt und im 200 mL-Ansatz bei einer Temperatur von 7,5 °C eingesetzt.

3.4.3 Aufnahme der Rückfaltungskinetik

Die Rückfaltungskinetik wurde über 100 – 140 h aufgenommen, dabei wurden in den Experimenten jeweils fünf verschiedene Proteinkonzentrationen eingesetzt (5 – 80 µg/mL Gesamtmonomerkonzentration im Rückfaltungspuffer). Die Experimente wurden unter gleichen Bedingungen im Rückfaltungspuffer III durchgeführt, das heißt bei 7,5 °C, einem pH-Wert von 7,5 und einem Redoxsystem Cystein/Cystin 5:1. Die Modellierungsexperimente wurden mit Rückfaltungsmethode B durchgeführt. Die verdünnte Proteinlösung wurde zur Stunde 0 als Batch in den Rückfaltungspuffer gegeben.

Die Auswertung und Modellierung der Rückfaltungskinetik wurde mit der Software MATLAB® 5.3 (The MathWorks Inc., Massachusetts, USA) und einer von Klaus Gollmer (FH, Trier) entwickelten BIOSS- (BioSimulation-System) Toolbox erstellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Produktion von rMLA und rMLB

Die Produktion rekombinanter Proteine als Inclusion Bodies findet aufgrund der einfachen Handhabung und Kultivierung vorzugsweise in *Escherichia coli* statt. In dieser Arbeit wurden die rekombinanten Mistellektinproteine in *E. coli* BL 21 (DE3)-Stämmen produziert. Sowohl die beiden Stämme mit den Genen der Mistellektinketten rMLA und rMLB als auch *E. coli* BL21/pT7 rMLB C21S-C194S (mrMLB) wurden zunächst in Schüttelkolbenkulturen angezogen, um das Wachstums- und Induktionsverhalten zu untersuchen. Während die Inclusion Bodies beim pT7 rMLB C21S-C194S-Stamm nur im Schüttelkolben produziert wurden, wurden rMLA und rMLB in 10 L-Batch-Kulturen hergestellt.

4.1.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Zunächst wurde das Induktionsverhalten in LB-Medium und definiertem Medium verglichen. LB-Medium wird üblicherweise als Standardmedium eingesetzt, um das Wachstum der Zellen zu überprüfen. Es ergeben sich aber keine definierten Mediumzusammensetzungen. Die Zellen wachsen in definiertem Medium zwar etwas langsamer als im LB-Medium heran, es werden aber in beiden Medien etwa gleich viel Inclusion Bodies gebildet. Daher wurde für die 10 L-Batch-Kultivierungen das definierte Medium verwendet.

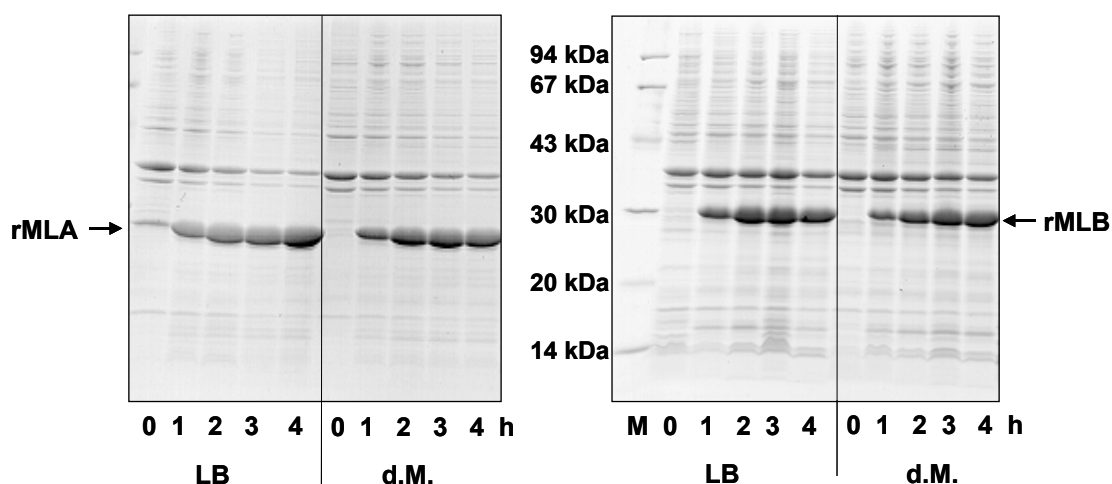


Abbildung 4.1: Inclusion Bodies-Herstellung im LB-Medium und definierten Medium
 Reduzierende SDS-PAGE; Coomassie®-Färbung; M: Low-Molecular-Weight-Marker; einmal gewaschene Inclusion Bodies. Proben wurden nach Induktion stündlich entnommen (0 – 4 h).

Das Wachstum des rMLA- und des rMLB-Stamms verläuft im Schüttelkolben ähnlich. Nach der Induktion mit IPTG wachsen die Stämme weiter und produzieren ca. gleich viel Inclusion Bodies (Abb. 4.1, S. 57). Vier Stunden nach der Induktion ist die Produktion der Mistellektinketten abgeschlossen und das Zellwachstum erreicht die stationäre Phase.

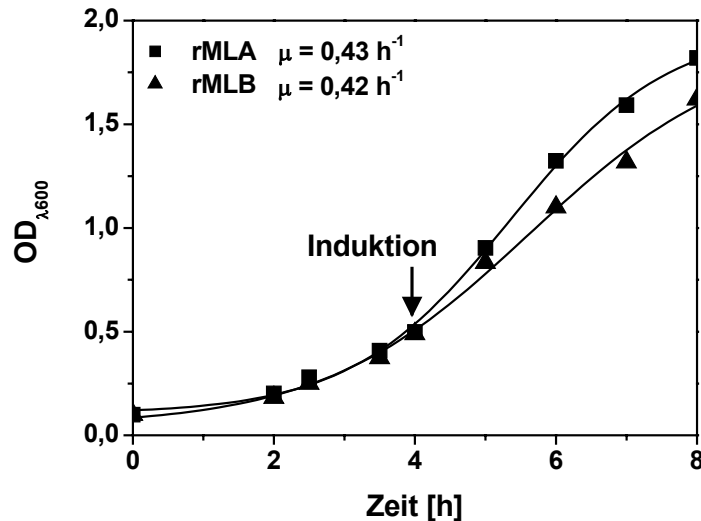


Abbildung 4.2: Kultivierung von *E. coli* BL21/pT7-MLA und BL21/pT7-MLB im Schüttelkolben

Wachstumskurve; kultiviert wurde in definiertem Medium; Induktion bei OD_{λ600} 0,5 mit 0,5 mM IPTG; μ : spezifische Wachstums geschwindigkeit

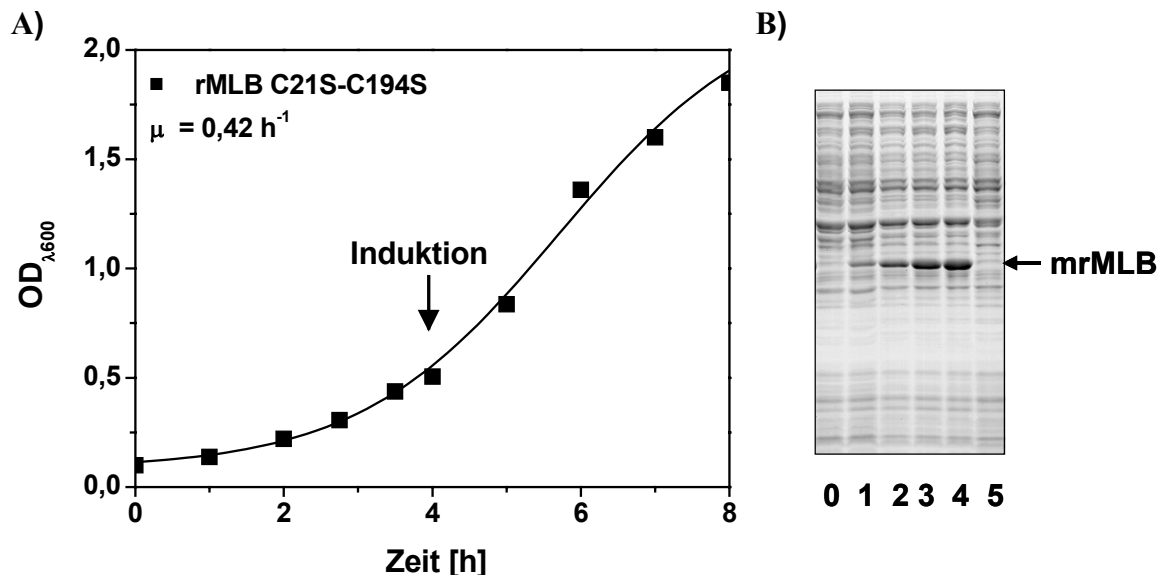


Abbildung 4.3: Kultivierung des *E. coli* BL21/pT7 rMLB C21S-C194S-Stammes im Schüttelkolben

A) Wachstumskurve; kultiviert wurde in definiertem Medium; Induktion bei OD_{λ600} 0,5 mit 0,5 mM IPTG; μ : spezifische Wachstums geschwindigkeit; B) Inclusion Bodies-Produktion: reduzierende SDS-PAGE; Coomassie®-Färbung; 0-4: Totalproteine; Proben wurden nach Induktion (0) stündlich entnommen; 5: lösliche Proteine nach Induktion (4 h)

Auch der pT7 rMLB C21S-C194S-Stamm unterscheidet sich weder im Wachstum noch in der Produktion von den anderen Stämmen.

Da nur eine Einflussüberprüfung der freien Cysteine auf die Renaturierungsausbeute durchgeführt werden sollte, wurden die mrMLB-Inclusion Bodies in vier 250 mL-Kulturen hergestellt. Daraus konnten 104,34 mg Inclusion Bodies aufgereinigt werden.

Lösliche rekombinante Mistellektinproteine sind bei keiner der Kultivierungen zu finden.

4.1.2 Kultivierung im Bioreaktor

Die rMLA- und rMLB-Inclusion Bodies wurden in 10 L-Batch-Kultivierungen gewonnen. Es wurden 130 g feuchte Zellmasse (~ 50 g Biotrockenmasse) des rMLA-Stamms hergestellt. Aus 65 g Feuchtmasse konnten nach Aufarbeitung ca. 5 g Inclusion Bodies isoliert werden. Bei dem rMLB-Stamm wurden von 265 g Feuchtmasse (~ 90 g Biotrockenmasse) 65 g aufgeschlossen und daraus ca. 4,5 g Inclusion Bodies aufgereinigt.

Die Kultivierung des rMLB-Stamms ist als Beispiel in Abbildung 4.4 (S. 60) beschrieben. Die optische Dichte $OD_{\lambda 600}$ bei der Induktion betrug ca. 5. Wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, ist der Glukoseverbrauch bei der rMLB-Stamm-Kultivierung zum Zellwachstum proportional, dementsprechend viel Zellmasse wird produziert. Der durch die Mikroorganismen aufgenommene Sauerstoff wird für das Wachstum, für Synthesereaktionen und den Erhaltungstoffwechsel verbraucht. Der Sauerstoffpartialdruck sinkt sehr schnell auf 20% ab. Der weiteren Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks kann durch Regulierung der Rührerdrehzahl entgegengewirkt werden. Mit einer Erhöhung der Rührerdrehzahl wird mehr Sauerstoff in das Medium eingetragen und der Stofftransport zur Zelle verbessert. Der Sauerstoffpartialdruck konnte auf diese Weise auf 20 % gehalten werden. Tritt eine Glukoselimitierung auf, so wird auch weniger Sauerstoff verbraucht, so dass die Rührerdrehzahl wieder verkleinert werden kann. Der Zellmassenaufbau nähert sich der stationären Phase und die Stoffwechselaktivitäten ändern sich.

Bei der Batch-Fermentation von *E. coli* entsteht aus Glukose oder anderen Kohlehydraten unter anderem Acetat, welches bei Erschöpfung der Kohlehydrate als Energiequelle für die zweite Wachstumsphase dient [Majewski and Domach 1990, Strudsholm et al. 1992]. Bei der rMLB-Stamm-Kultivierung wird die Glukose gleichmäßig verbraucht und dementsprechend proportional Säuren gebildet, welches an dem Verbrauch an Ammoniak (Laugenverbrauch) zu beobachten ist. Bei Glukosemangel (≤ 1 g/L) wird kein Ammoniak mehr verbraucht, was darauf hindeutet, dass die gebildeten Säuren als Energiequelle genutzt werden.

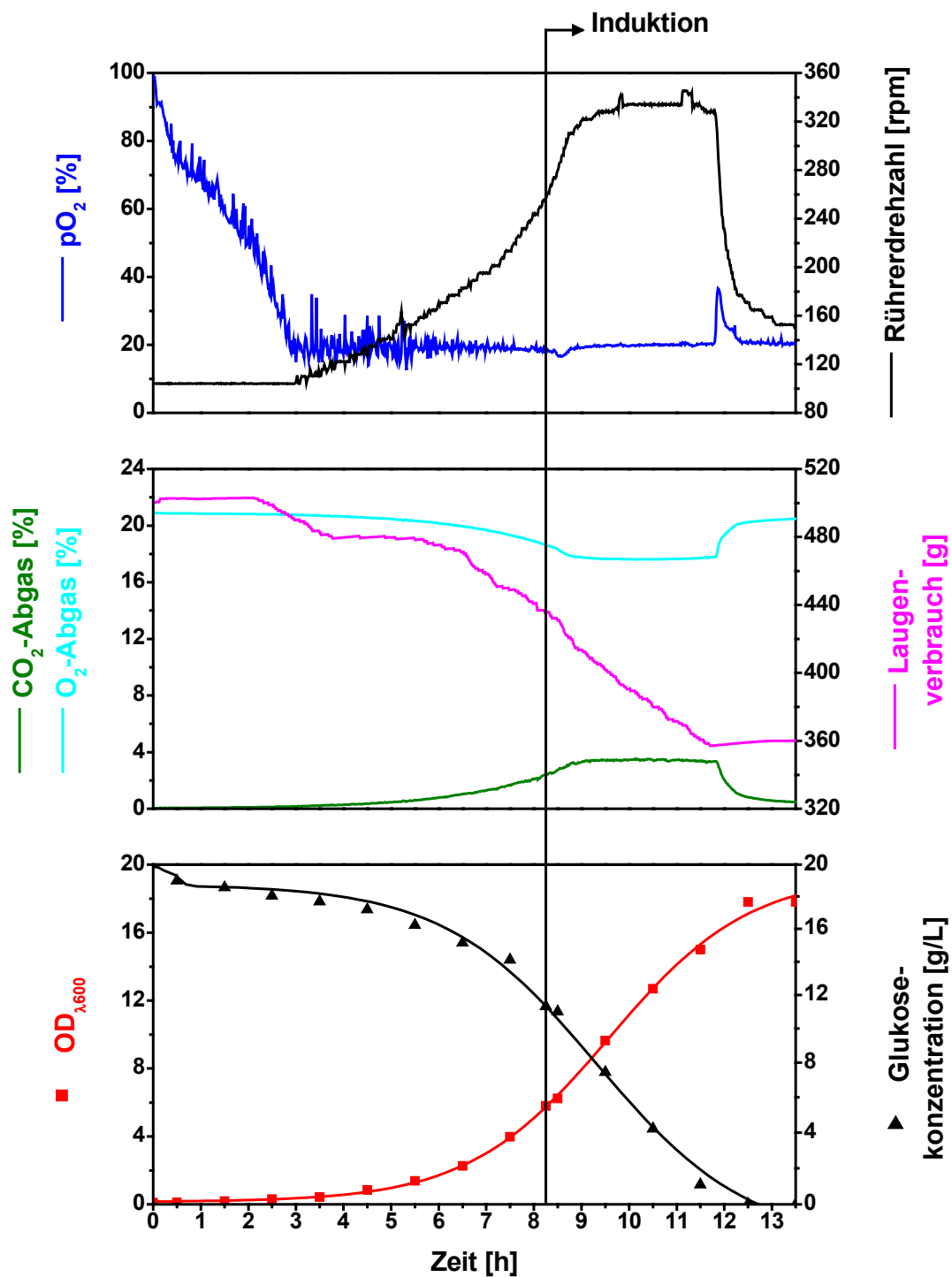


Abbildung 4.4: 10 L-Batch-Kultivierung im Bioreaktor

E. coli BL21/pT7 MLB wurde in definiertem Medium kultiviert; μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit entspricht $\sim 0,48 \text{ h}^{-1}$; Induktion bei $OD_{\lambda 600} \sim 5$ mit 0,5 mM IPTG; Kultivierungstemperatur: 30°C ; Zuluftstrom: 0,5 vvm; Lauge: 12,5 %-ige Ammoniaklösung (Verbrauch als Gewichtsabnahme gemessen)

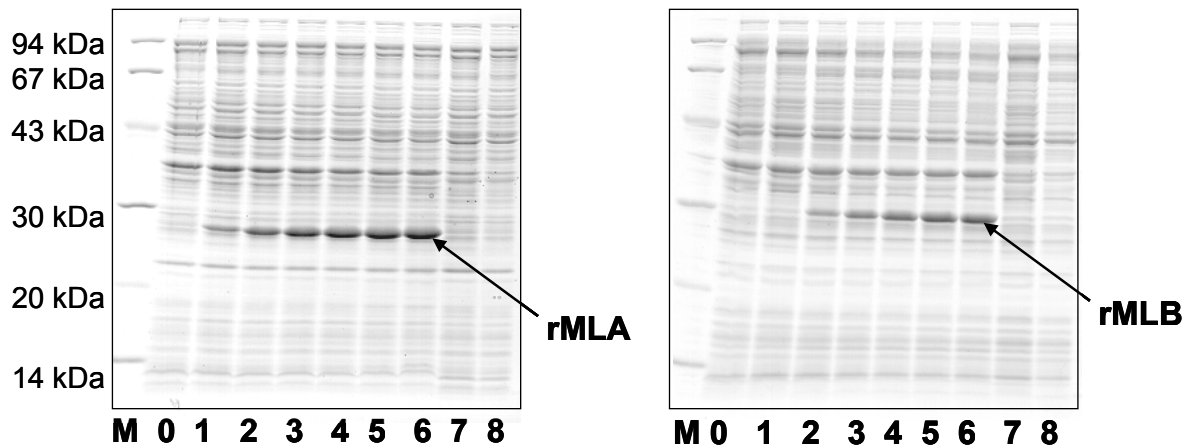


Abbildung 4.5: rMLA und rMLB-Inclusion Bodies-Bildung im Bioreaktor

Reduzierende SDS-PAGE; Coomassie®-Färbung; M: Low-Molecular-Weight-Marker, 0: Totalprotein direkt nach Induktion, 1 – 6: Totalprotein nach Induktion (0) (bei rMLA: jede Stunde; bei rMLB: 15 min, 1 h 15 min – 5 h 15 min jede Stunde), 7: lösliche Zellbestandteile vor Induktion, 8: lösliche Zellbestandteile nach Induktion am Ende der Kultivierung

Nach einer Stunde ist Inclusion Bodies-Bildung gut zu erkennen, die sich nach ca. 4 h nicht mehr weiter erhöht. Wie schon oben erwähnt wurde, sind auch hier in den löslichen Fraktionen keine rekombinanten Mistellektinproteine enthalten.

4.2 Aufarbeitung von rMLA und rMLB

4.2.1 Inclusion Bodies-Aufreinigung

Mittels des Zellaufschlusses mit Ultraschall konnten die Inclusion Bodies aus der Zelle freigesetzt werden. Durch Zentrifugation werden die löslichen Zellbestandteile abgetrennt. Der ein nicht-ionisches Detergenz enthaltende Waschpuffer eignete sich, um die löslichen Zellbestandteile wie die Membranproteine zum größten Teil entfernen zu können, so dass man verhältnismäßig reine Inclusion Bodies erhielt.

Die abzentrifugierten Inclusion Bodies sind anschließend direkt für die Renaturierung eingesetzt worden. Es waren keine weiteren Aufreinigungsschritte notwendig. Sie können über mehrere Jahre bei -70°C gelagert werden.

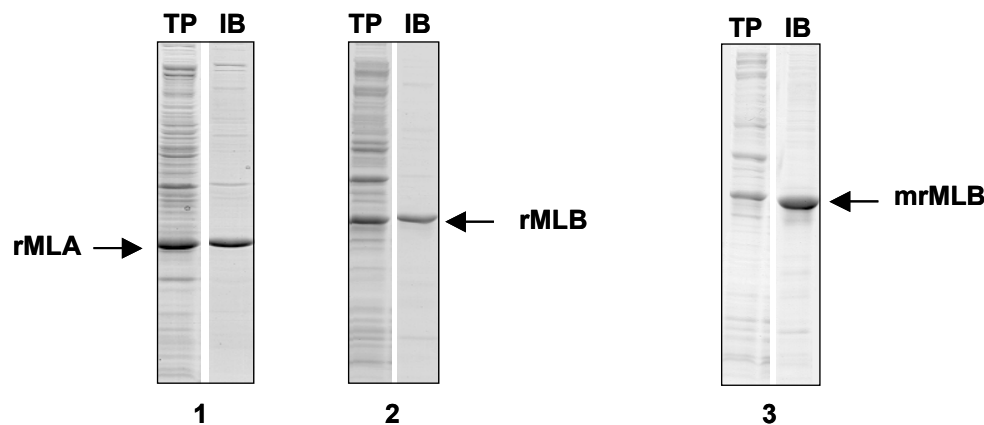


Abbildung 4.6: Aufreinigung der Inclusion Bodies

Reduzierende SDS-PAGE; Coomassie[®]-Färbung; TP: Totalprotein nach Zellaufschluss mit Ultraschall; IB: mit Waschpuffer gewaschene Inclusion Bodies; 1: Zellproteine des rMLA-Stamms; 2: Zellproteine des rMLB-Stamms; 3: Zellproteine des pT7 rMLB-C21S-C194S-Stamms

4.2.2 Problemstellung bei der rML-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA/ELLA

Die Konzentration des renaturierten rekombinanten Mistellektins lässt sich mittels ELISA bzw. ELLA nicht bestimmen, wenn das Produkt im Rückfaltungspuffer unter aeroben Bedingungen vorliegt. Das rML ist instabil, wenn in dem Rückfaltungspuffer das Redoxsystem enthalten ist. Die anderen Bestandteile des Rückfaltungspuffers haben keinen Einfluss auf die immunologischen Quantifizierungsmethoden.

Verschiedene Methoden wurden getestet, um diese Problematik zu beheben:

Die Rückfaltungsansätze zu verdünnen ist nicht effektiv, da auch bei hoher Verdünnung (bis 1:200) das rML nicht stabil bleibt. Die Proteinkonzentration ist für die Methode zu gering. Bei einem Wechsel des Puffersystems durch Dialyse wird nur ein Teil des rML wiedergefunden. Auch eine Blockierung der freien Thiole des Redoxsystems mit Iodacetat oder Maleinimid ergibt keine brauchbaren Ergebnisse, da diese Stoffe auf die ELISA-Analytik wirken. Das Iodacetat verursacht zudem durch eine leichte Eigengelbfärbung bei der photometrischen Messung eine Störung.

Daher musste der Rückfaltungspuffer mittels Ultrafiltration ausgetauscht werden, welcher durch einen Natriumphosphatpuffer ersetzt wurde.

Verschiedene Umpufferungssysteme wurden von Vivascience (Großbritannien) und Millipore (Massachusetts, USA) auf die Fähigkeit hin untersucht, den Puffer auszutauschen, ohne mit den Proteinen in Wechselwirkung zu treten. Die Membranen der Ultrafiltrationseinheiten wurden zunächst ohne Absättigung eingesetzt. Es wurde jedoch festgestellt, dass

rMLB eine sehr hohe unspezifische Bindungsaffinität zu allen Membranen aufweist. Aus diesem Grund müssen die Membranen zuvor mit einem Tween-haltigen Puffer abgesättigt werden (Verbesserung um ca. 10 %). Mit den PES- und CTA-Membranen gehen die Proteine verstärkt eine Bindung ein, so dass nur maximal 50 % der rMLB-Derivate, das heißt also auch rML, wieder gefunden werden. Die abgesättigte, regenerierte Cellulose (RC) zeigt eine nicht so hohe Affinität zu rMLB, so dass durchschnittlich 80 % der eingesetzten Proteinkonzentration ermittelt werden können. Die besten Ergebnisse werden mit den Amicon[®] Ultra-4-Einheiten (regenerierte Cellulose, 10.000 MWCO) erzielt. Es wurde mit einer Membranporengröße unter 30.000 MWCO gearbeitet, damit auch die Monomere zurückgehalten werden. Die in einem minimalen Endvolumen von ca. 50 - 100 µL vorliegenden Proteine werden in einem gleichen Anfangsvolumen Natriumphosphatpuffer resuspendiert, und rML kann anschließend mittels ELISA/ELLA reproduzierbar analysiert werden. Da bei jeder Umpufferung ein Standard mitgeführt wird, kann so der Verlust (ca. 20 %) festgestellt und der Fehler einberechnet werden. Der ELISA an sich beinhaltet einen Fehler von ca. 10 %. Die anderen Proteine wurden mittels Gelelektrophorese und Quantiscan (BIOSOFT[®], Großbritannien) quantifiziert.

4.3 Optimierung der Rückfaltung

Bei industriell hergestellten Produkten wird versucht möglichst ökonomisch zu arbeiten, das heißt, in einer kurzen Zeit, viel Material mit wenig Kosten zu produzieren. Um dieses zu erreichen, müssen die Prozesse in Vorversuchen optimiert werden, um sie anschließend im „Scale up“ im großen Maßstab umzusetzen.

Das hier herzustellende rekombinante Mistellektin I befand sich zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns in klinischer Studie Phase I. Mit dem vorhandenen Herstellungsprozess (Abb. 4.7, S. 64) wurden nur sehr niedrige Ausbeuten (durchschnittlich 5 %, max. Ausbeute 10 %) erreicht, das heißt, aus 20 µg/mL eingesetzter Inclusion Bodies-Konzentration wurden durchschnittlich 1 µg/mL rML gebildet. Die Produktionskosten sind damit sehr hoch, es werden aber auch nur geringe Mengen für den therapeutischen Bedarf benötigt (Kapitel 2.2.2.2). In der Erwartung, dass rekombinantes Mistellektin I in der Krebsforschung gute Erfolge erreichen könnte, wurde eine kosteneffektive Prozessoptimierung angestrebt.

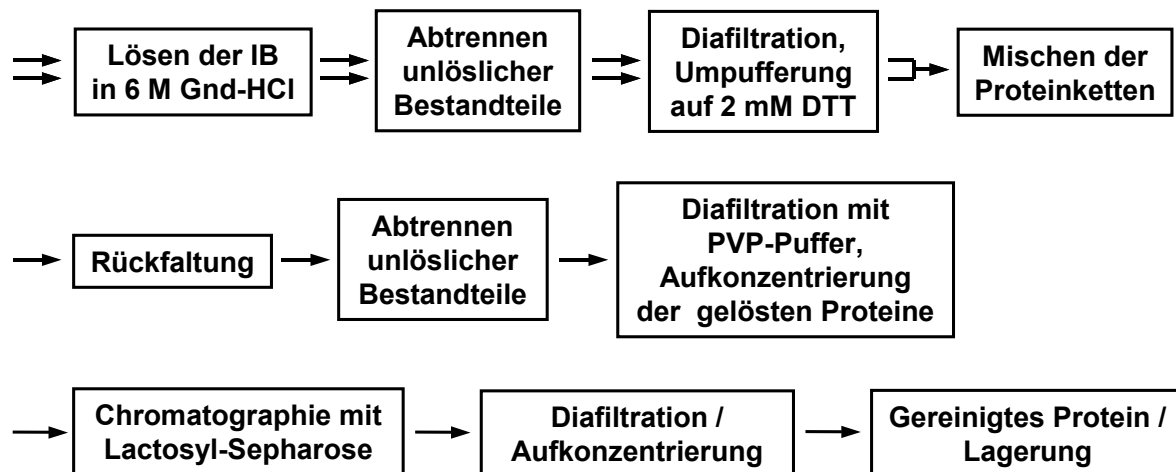


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des existenten Herstellungsprozesses der Viscum AG

4.3.1 Rückfaltungsmethoden

Ein Standardprozess bei der Rückfaltung von Proteinen ist die Verdünnung. Zunächst werden die Inclusion Bodies unter denaturierenden Bedingungen (Guanidin) gelöst und mittels DTT reduziert. Es sind zwei Rückfaltungsmethoden (A und B) mit unterschiedlichen Rückfaltungspuffern eingesetzt worden. Es wurde aufgrund von besseren Ergebnissen (höhere Löslichkeit und Ausbeute) mit der Methode B weitergearbeitet. Bei der Methode A werden die gelösten, reduzierten Proteine direkt in den Rückfaltungspuffer gegeben („direkte Verdünnung“). Bei der Methode B werden sie zunächst in einen weiteren Guanidin-haltigen Puffer gegeben, um den pH-Wert zu senken und das Reduktionsmittel zu minimieren. Schließlich wird die Proteinlösung dem Rückfaltungspuffer zugesetzt („Verdünnung“), um das korrekt gefaltete Dimer zu erhalten.

In Vorversuchen in kleinerem Maßstab (1 mL und 33 mL) wurden Rückfaltungstechnik, Puffereinflüsse und Löslichkeit der Proteine untersucht. Zunächst wurden die Versuche im 1 mL-Maßstab in Eppendorfgläsern durchgeführt, wobei hier nur Aussagen über die Löslichkeit getroffen werden konnten. Es zeigte sich später, dass der Rückfaltungsprozess möglichst unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt werden sollte. Wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben wird, bildet sich das Dimer nur mit einem sehr begrenzten Redoxsystemverhältnis. Sauerstoff ist im Verhältnis zum Cystin ein sehr starkes Oxidationsmittel. Es kann Cystein oxidieren und so das im Rückfaltungspuffer vorliegende Redoxsystemverhältnis ändern. Aufgrund des daraus resultierenden Mangels an Reduktionsmittel

können eher falsche inter und –intramolekulare Disulfidbindungen entstehen. Die Bildung des rekombinanten Mistellektins wird eingeschränkt oder sogar verhindert.

Ein Sauerstoffausschluss konnte trotz des Begasens der Puffer mit Stickstoff vor der Zugabe der Ketten und dem regelmäßigen Übersichten nicht erhalten werden. Daher wurde später in 50 mL-Schottflaschen (33 mL-Ansatz) gearbeitet, in welchen rML gebildet wurde. Die Schottflaschen sind ebenfalls nicht dicht genug, um die benötigten anaeroben Bedingungen einzuhalten, so dass nur geringe Mengen rML entstanden. Es konnte kein konstanter Sauerstoffausschluss in jedem Gefäß gleichermaßen gewährleistet werden.

In einem Sixfors-System der Firma Infors (Schweiz) im 200 mL-Maßstab wurden die Optimierungs- und Kinetikversuche durchgeführt. Erst hier können die Bedingungen konstant und für alle sechs Reaktoren des Systems innerhalb eines Experimentes gleich gehalten werden. Die Produktendausbeuten sind in den 200 mL-Ansätzen reproduzierbar. Es zeigte sich jedoch bei den Kinetikexperimenten, dass auch hier Sauerstoffschwankungen bei den verschiedenen Experimenten vorlagen und so den Vergleich des Ablaufs der Rückfaltungsprozesse erschwerten (Kapitel 4.4).

4.3.2 Löslichkeit der Proteine

Da bei der Rückfaltung die Löslichkeit und damit die Verfügbarkeit der einzelnen Ketten zur Bildung des Dimers ein wichtiger Faktor ist, wurde versucht durch den Einsatz verschiedener Substanzen (Detergenzien, chaotroper Agenzien und Zwitterionen) und unterschiedlicher Bedingungen die Proteine in Lösung zu halten. Stabilisierende oder destabilisierende Lösungskomponenten in Rückfaltungspuffern können die Ausbeute erheblich verbessern, besonders im Falle der Bildung inaktiver Aggregate. Sie können Intermediate beschützen, aber auch zu konkurrierenden, falschen intermolekularen Wechselwirkungen führen.

4.3.2.1 Löslichkeit der Monomere

Sieht man sich zunächst Rückfaltungsansätze der einzelnen Ketten an, so verhalten sich diese unterschiedlich. Ein Großteil der Proteine, sowohl die des rMLA als auch des rMLB, fallen aus. Dabei bilden sie in der ersten halben Prozessstunde weiße flockige Aggregate, die bei der rMLB-Kette größer als bei der rMLA-Kette sind und sich über die Prozessdauer etwas vergrößern. Ein Teil des Cystein/Cystin-Redoxsystems fällt ebenfalls aus und setzt sich wie auch die Proteinaggregate auf dem Reaktorboden ab (Abb. 4.9, S. 67). Es ist

davon auszugehen, dass die unlöslichen Proteine an dem Prozessgeschehen nicht mehr weiter beteiligt sind.

Der unlösliche Anteil der rMLA-Kette fällt sofort nach der Zugabe der Proteinlösung in den Rückfaltungsansatz aus (Abb. 4.8). Mit zunehmender Proteinkonzentration gehen die rMLA-Proteine nicht proportional in Lösung, sondern fallen vermehrt aus. Es steht jedoch bezogen auf eine rML-Bildung reaktionsfähiges, gelöstes rMLA in ausreichender Konzentration zur Verfügung.

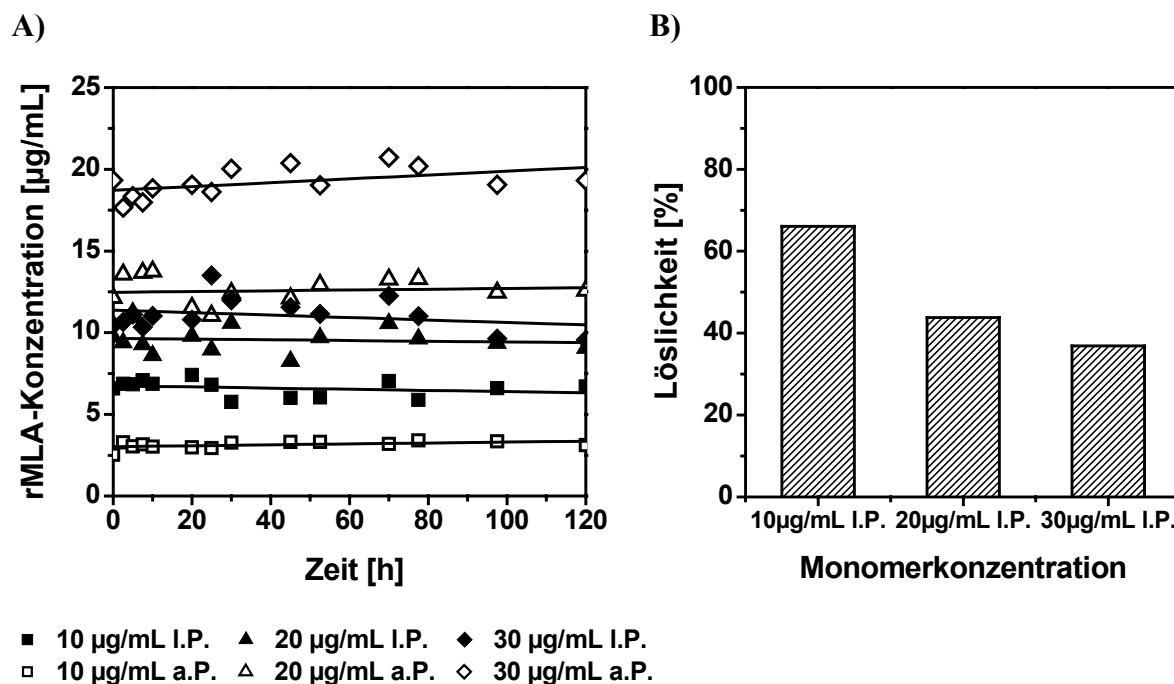


Abbildung 4.8: Löslichkeit von rMLA

A) Zeitverlauf eines reinen rMLA-Rückfaltungsansatzes im Rückfaltungspuffer III mit verschiedenen Konzentrationen (10 – 30 $\mu\text{g/mL}$ Monomerkonzentration); B) durchschnittlicher, prozentualer Anteil von gelöstem rMLA bei 10 – 30 $\mu\text{g/mL}$ Monomerkonzentration; I.P. gelöste Proteine



Abbildung 4.9: Aggregatbildung im Rückfaltungspuffer

200 mL Ansatz; Rückfaltungspuffer III; 40 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; Aggregatbildung bei rMLA feiner als bei rMLB; vollständige Aggregatablagerung nach ca. 2 h (10 rpm)

Die rMLB-Kette fällt währenddessen zunächst zu einem großen Teil gleich nach der Zugabe aus, ein weiterer Teil dann über einen Zeitraum von 20 – 40 h (Abb. 4.10, S. 68), so dass das lösliche, reaktionsfähige rMLB zu einem limitierenden Faktor für die Rückfaltungsreaktion wird.

Die SDS-PAGE zeigt, dass das gelöste rMLB zunächst in verschiedenen Strukturen, das heißt in verschiedenen Disulfid-verbrückten Isomeren und Polymeren vorliegt. Ab ca. 45 h kommt die rMLB-Kette hauptsächlich nur noch in der korrekt gefalteten Form vor (Abb. 4.11. S. 68). Diese Änderung hat eine Auswirkung auf die Rückfaltung, wie im Kapitel 4.3.8 näher beschrieben wird. Bei den ausgefallenen Proteinen fiel ein kleines Protein (ca. 14 kDa) auf, welches zunächst für einen Teil der rMLB-Kette gehalten wurde. Es stellte sich jedoch durch die Analyse mittels MALDI-TOF heraus, dass es sich um ein kleines Hitzeschockprotein handelt. Es wurden die erhaltenen Massen mit der NCBI-BLAST2-Protein-Datenbank verglichen und die angenommenen Aminosäuresequenzstücke dann erneut mit vorhandenen Aminosäuresequenzen von Mikroorganismen gegenübergestellt. Dabei wurde das „Inclusion Bodies Protein A“ (IbpA) von *E. coli* identifiziert (Kapitel 7.2). IbpA und IbpB sind 16 kDa groß und werden in *E. coli* während der Überexpression von artfremden Proteinen gebildet, mit denen sie assoziiert sind [Allen et al. 1992]. Die Aminosäuresequenz des IbpB entsprach nicht der Masse zugeordneten, identifizierten Sequenzen, jedoch stehen die Aminosäuresequenzen des *E. coli* BL21 noch nicht zur Verfügung.

Der Hauptteil der ausgefallenen rMLB-Proteine verbleibt aufgrund von Aggregation bei einer nicht reduzierenden Gelelektrophorese in den Taschen.

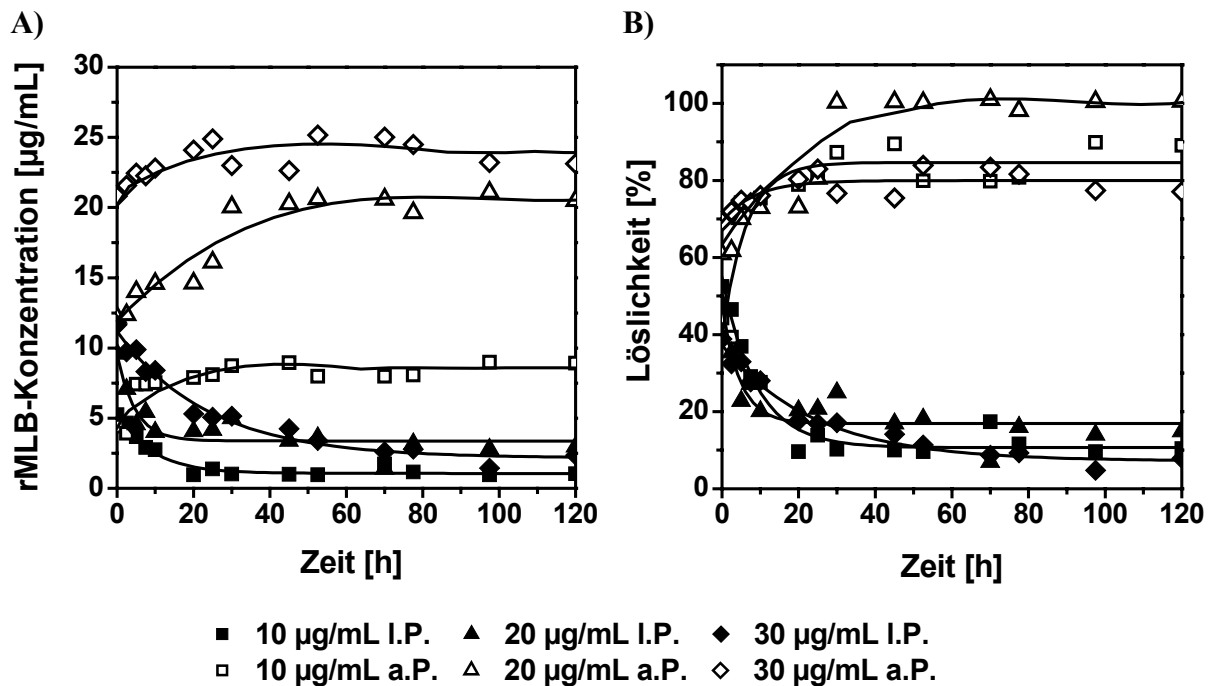


Abbildung 4.10: Löslichkeit von rMLB

I.P.: lösliche Proteine; a.P.: ausgefallene Proteine; A) Zeitverlauf eines reinen rMLB-Rückfaltungsansatzes im Rückfaltungspuffer III mit verschiedenen Konzentration (10 - 30 $\mu\text{g/mL}$ Monomerkonzentration); B) Zeitverlauf der prozentualen Löslichkeit von rMLB bei 10 - 30 $\mu\text{g/mL}$ Monomerkonzentration

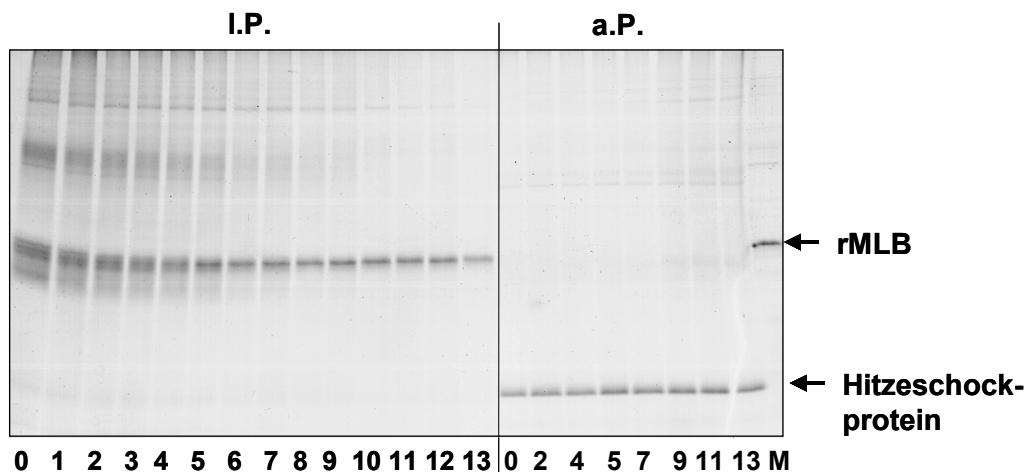


Abbildung 4.11: Löslichkeit von rMLB, SDS-PAGE

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; colloidale Coomassie®-Färbung; Rückfaltungspuffer III; 30 μg rMLB/mL Spuren 0 – 13: 0 h, 2,5 h, 5 h, 7,5 h, 10 h, 20 h, 25 h, 30 h, 45 h, 52,5 h, 70 h, 77,5 h, 97,5 h und 120 h; M: rMLB-Monomer; I.P.: lösliche Proteine; a.P.: ausgefallene Proteine. Ausgefallenes rMLB ist hier nicht zu erkennen, da es in den Gel-taschen verbleibt.

4.3.2.2 Löslichkeit der Proteine im Rückfaltungsansatz

Bei den Rückfaltungsansätzen zur Bildung von rML ist das Löslichkeitsverhalten von rMLB ähnlich wie bei den Monomeransätzen. Das rMLB im Überstand scheint sehr viele verschiedene Disulfid-verbrückte Strukturen zu besitzen, die sich im Gel zu einem hohen Anteil um die rMLA-Bande sammeln. Durch seine neun Cysteingruppen bildet es verschiedene Strukturen aus, die zu einem zerlaufenden Bandenspektrum führen (Abb. 4.12, Nr. 1, 2 und 5). Das rMLA liegt als Mono- und als Dimer vor (Abb. 4.12, Nr. 3 und 4). Bei den 40 red:1 ox-Glutathion-Redox-Ansätzen ist die rMLB-Bande konzentrierter, da die intramolekularen Disulfidbrücken reduziert werden (Abb. 4.12, Nr. 6).

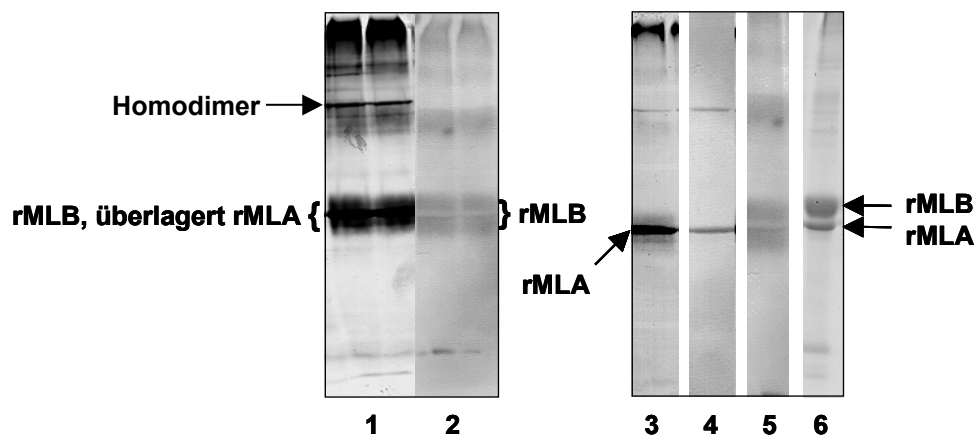


Abbildung 4.12: rMLB-Ketten-Spektrum im Rückfaltungsansatz

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; lösliche Proteine; direkte Verdünnung in den Rückfaltungspuffer II im 1 mL-Ansatz, Western Blot mit Gradientengelen, ein Teil der Proteine bleibt hier in der Matrix zurück und wurde mittels Silberfärbung detektiert; 1: Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer I, gemeinsame Zugabe von rMLA und rMLB, 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration (Glutathion-Redoxsystem 2 red:1 ox, 1 mL-Ansatz); 2: Western Blot von 1, Immunfärbung mit Antikörper 2.3.1-B gegen rMLB; 3: Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer II, gemeinsame Zugabe von rMLA und rMLB, 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration (Glutathion-Redoxsystem 2 red:1 ox, 1 mL-Ansatz); 4: Western Blot von 3, Immunfärbung mit Antikörper TA5 gegen rMLA; 5: Western Blot von 3, Immunfärbung mit Antikörper 2.3.1-B gegen rMLB; 6: Rückfaltungsansatz unter reduzierenden Bedingungen, 30 µg/mL rMLB und 10 µg/mL rMLA (Glutathion-Redoxsystem 40 red:1 ox)

Bei den verschiedenen Rückfaltungspuffern ist unterschiedliches Löslichkeitsverhalten zu beobachten (Abb. 4.14, S. 71). Es ist zu erkennen, dass rMLB beim Rückfaltungspuffer II

vermehrt ausfällt, während beim Rückfaltungspuffer I das rMLB gelöst ist (Abb. 4.13, S. 70). rMLB bindet weniger mit Coomassie[®] als rMLA und daher treten schwächere Banden im Gel auf. Ebenso ist die rMLA-Löslichkeit bei dem Rückfaltungspuffer I wesentlich höher. Das Agens CHES (Abb. 4.14, S. 71 und Abb. 4.17, S. 74) erhöht die Löslichkeit der Proteine. Bei einer Variationen des Rückfaltungspuffers I ergab sich, dass 1 M CHES in Verbindung mit Triton X-100 (2 % v/v) die Löslichkeit noch etwas verbesserte. Agenzien wie Nicotinsäure, 3-(1-Pyridino)-1-Propansulfonat oder Pyridin-3-sulfonsäure erbrachten zwar eine größere Löslichkeit als der Rückfaltungspuffer II, aber wesentlich weniger als CHES (keine Abbildung). Die meisten Proteine gingen mit 0,75 M Arginin (Abb. 4.17, S. 74) in Lösung, jedoch ist bei allen löslichkeitserhöhenden Substanzen auch eine größer Menge eines unerwünschten Homodimers gelöst (Kapitel 4.3.3) und es wird weniger rML gebildet (Tabelle 4.1, S. 71).

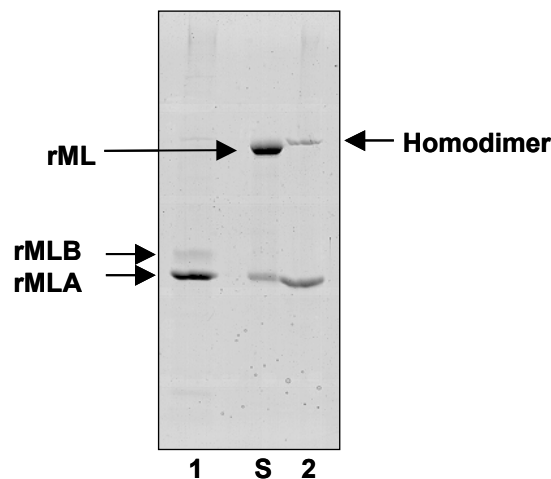


Abbildung 4.13: Ausgefallene Proteine in verschiedenen Puffern

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; Coomassie[®]-Färbung; 1mL-Ansatz; 1: Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer II; 2: Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer I; S: 0,3345 µg rML-Standard

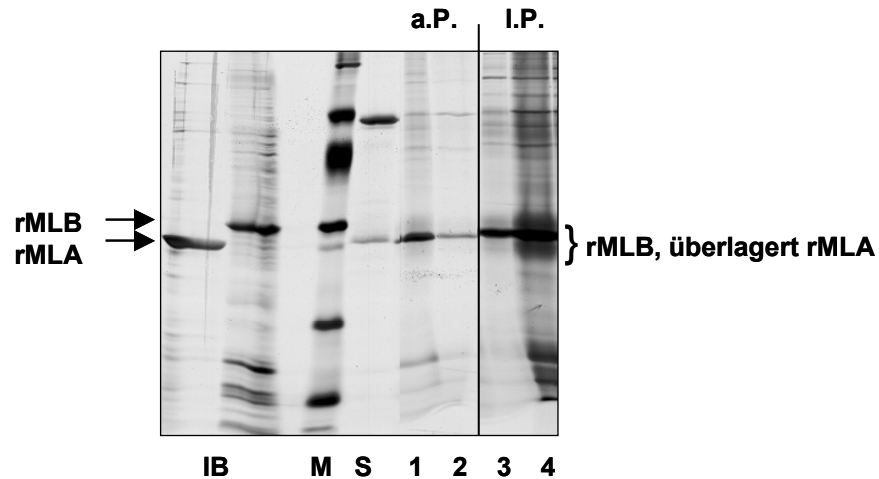


Abbildung 4.14: Löslichkeit der Proteine in verschiedenen Puffersystemen

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; Silberfärbung; a.P.: ausgefallene Proteine; l.P.: gelöste Proteine; IB: gewaschene Inclusion Bodies; S: 0,3345 µg rML-Standard; M: Low-Molecular-Weight-Marker; 1 + 3: Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer II; 2 + 4: Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer I mit 1 M CHES

Tabelle 4.1: Rückfaltungsausbeuten in verschiedenen Puffersystemen

Ausgangsgesamtkonzentration: 20 µg/mL; rML-Endkonzentration nach 80 h; 33 mL-Ansätze; umgepufferte Rückfaltungsansätze (Vivaspin®, 5000 MWCO, Vivascience, Großbritannien)

	rML-Konzentration [ng/mL]	Ausbeute [%]
Rückfaltungspuffer II, 10 mM Cystein/1 mM Cystin; 10 °C; pH 7,2	250	1,25
Rückfaltungspuffer II, Glutathion 4 mM red/2 mM ox; 10 °C; pH 7,5	217	1,08
Rückfaltungspuffer I, 1 M CHES; Glutathion 4 mM red/2 mM ox; 10 °C; pH 7,5	10	0,05
Rückfaltungspuffer I, 0,75M Arginin; 10 mM Cystein/1 mM Cystin; 10 °C; pH 8	14	0,07
0,5 M Arginin, 2 mM EDTA, Glutathion 0,45 mM red/0,45 mM ox; 10 °C; pH 8	25	0,13

An den gemessenen Werten kann man erkennen, dass bei den Puffern mit Additiven trotz der erhöhten Löslichkeit der Proteine viel weniger rML gebildet wird. Daraus ergab sich, dass mit dem Rückfaltungspuffer II und später mit dem Rückfaltungspuffer III weitergearbeitet wurde (Kapitel 4.3.7).

Aber nicht nur Chemikalien haben Auswirkung auf die Löslichkeit der Proteine. Auch Proteinzugabeart, Temperatur und pH-Wert haben einen starken Einfluss, worauf in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

4.3.3 Bildung eines Homodimers (rMLAA)

Proteine, die bei der Faltung Disulfidbindungen ausbilden, werden sowohl durch native, nicht-kovalente Wechselwirkungen als auch durch kovalente, chemische Bindungen stabilisiert.

Im Falle von Proteinen mit mehreren Disulfidbindungen steigt die Zahl der möglichen Kombinationen rapide; bei zehn Cysteinen sind 945 Kombinationen möglich [Anfinsen and Scheraga 1975].

Bei den Rückfaltungsansätzen fällt ein Dimer auf, welches im SDS-PAGE knapp über der rML-Bande (~ 58 kDa) liegt und sich sowohl in der löslichen als auch unlöslichen Fraktion des Rückfaltungsansatzes befindet. Dieses ist auch schon im Verdünnungspuffer vorhanden und scheint sich wesentlich schneller als das rML zu bilden und stabiler zu sein.

Um herauszufinden, um welches Dimer es sich bei dem ausgefallenen handelt, wurden Ansätze nur mit rMLA- bzw. rMLB-Inclusion Bodies durchgeführt, wobei sich bei dem rMLA-Ansatz wiederum ein Dimer bildete (Abb. 4.15, S. 73). Außerdem konnte dieses auch mittels Western Blot bestätigt werden (siehe auch Abb. 4.12, Nr. 2, S. 69; keine Anfärbung des Dimers durch den rMLB-Antikörper). Folglich muss es sich hierbei um ein Dimer des rMLA handeln.

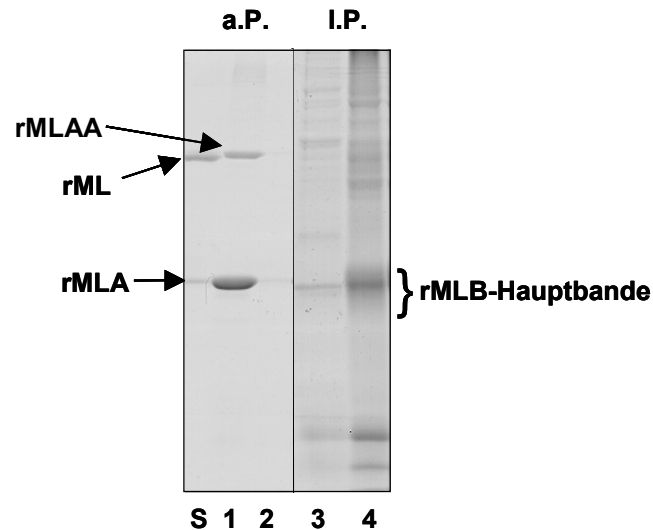


Abbildung 4.15: reine rMLA und rMLB-Ansätze

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; Coomassie®-Färbung; a.P.: ausgefallene Proteine; I.P.: lösliche Proteine; S: 0,3345 µg rML-Standard; 1 + 3: Rückfaltungsansatz mit rMLA (40 µg/mL Gesamtproteinkonzentration); 2 + 4: reiner rMLB-Ansatz (60 µg/mL Gesamtproteinkonzentration), ausgefallenen rMLB-Proteine bleiben in den Geltaschen zurück

Mistellektin trennt sich bei einem Redoxsystem von 40 red:1 ox in seine Ketten auf, während die Ansätze mit rMLAA immer noch eine schwache Dimerbande zeigen (Abb. 4.16). Unter stark reduzierenden Bedingungen (Zugabe von DTT) ist jedoch kein rMLAA mehr zu erkennen. Das rMLAA entsteht schon im schwach reduzierenden Guanidin-haltigen Verdünnungspuffer (~ 2 mM DTT).

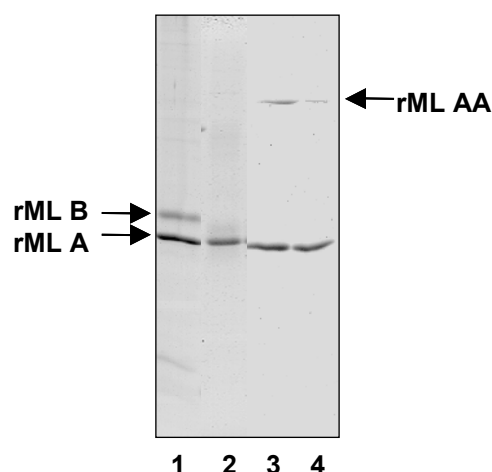


Abbildung 4.16: Stabilität der Dimere unter reduzierenden Bedingungen

Ausgefallene Proteine: Coomassie®-Färbung; 1: Rückfaltungsansatz, der vorher rMLAA enthielt, versetzt mit DTT; 2: rML-Standard mit einem Glutathion-Redoxsystem 40 red:1 ox; 3: Rückfaltungsansatz mit rMLAA; 4: Rückfaltungsansatz mit schwacher Bande des rMLAA mit einem Glutathion-Redoxsystem 40 red:1 ox

Die meisten Chemikalien, welche die Löslichkeit der Proteine erhöhen, weisen eine verstärkte Ansammlung des rMLAA-Dimers in der löslichen Fraktion auf und das rML wird wesentlich weniger gebildet. Abbildung 4.17 zeigt die erhöhte Löslichkeit der Proteine in den Rückfaltungsansätzen mit Additiven.

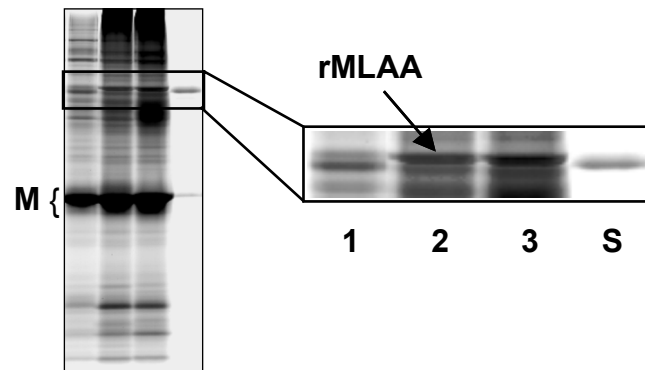


Abbildung 4.17: Konzentration der verschiedenen Dimere in unterschiedlichen Puffersystemen

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; Silberfärbung; lösliche Proteine; S: 0,3345 µg rML-Standard; M: Monomere (rMLA und rMLB); 1: Rückfaltungsansatz (20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration) im Rückfaltungspuffer II; 2: Rückfaltungsansatz (20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration) im Rückfaltungspuffer I mit 1 M CHES; 3: Rückfaltungspuffer I mit 0,5 M Arginin

Ob das vorhandene Homodimer nur verstärkt in Lösung geht oder auch zusätzlich neues gebildet wird, konnte nicht bestimmt werden.

4.3.4 Variation der Proteinzugabe

Die Art und Weise, die Proteine in den Rückfaltungspuffer zu geben, wirkt sich sowohl auf die Löslichkeit als auch auf die Ausbeute aus. Im Herstellungsprozess der Viscum AG (Deutschland) wurden die verdünnten Proteine kontinuierlich über mehrere Stunden in den Rückfaltungspuffer gepumpt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Zugabearten untersucht. Zunächst wurden die gelösten Ketten kurz hintereinander in verschiedener Reihenfolge in den Rückfaltungspuffer gegeben, wobei im Vergleich zur gemeinsamen Zuführung eine schlechtere Löslichkeit der rMLA-Kette zu verzeichnen ist (Abb. 4.18, S. 75). Wurde die rMLA-Kette zuerst hineingegeben, so ist zudem auch noch mehr rMLAA vorhanden, so dass die Ketten für die nachfolgenden Versuche vor Zugabe in den Rückfaltungspuffer zusammengegeben wurden.

In Abbildung 4.19 (S. 75) ist zu erkennen, dass eine pulsweise Zugabe der Inclusion Bodies-Lösung nicht nur für die Löslichkeit der Proteine förderlich ist, sondern eine

prozentuale Verbesserung der rML-Bildung um bis zu 25 % erbringt. Das rML bildet sich wesentlich besser, wenn in bestimmten Abständen neue Monomere dazugegeben werden, so dass nicht gleich eine große Menge rMLB aggregiert (Kapitel 4.3.2.1) und rMLA mit schon gefaltetem rMLB abreagieren kann. Es wurden verschiedene Zeitpunkte der Pulszugabe gewählt (15, 30 und 60 Minuten), dabei kann kein signifikanter Unterschied ermittelt werden, so dass die Proteinzugabepulse für die folgenden Versuche auf eine Stunde festgelegt wurden.

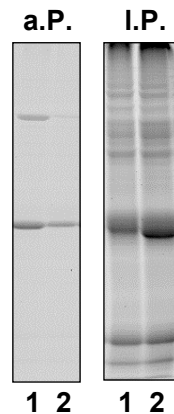


Abbildung 4.18: Getrennte und gemeinsame Zugabe der rMLA und rMLB-Ketten

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; Coomassie®-Färbung; a.P.: ausgefallene Proteine; l.P.: lösliche Proteine; Rückfaltungspuffer I; 1: Zugabe der Proteinketten hintereinander (rMLA vor rMLB; je 10 µg/mL); 2: Gemeinsame Zugabe der Proteinketten (rMLA + rMLB; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration)

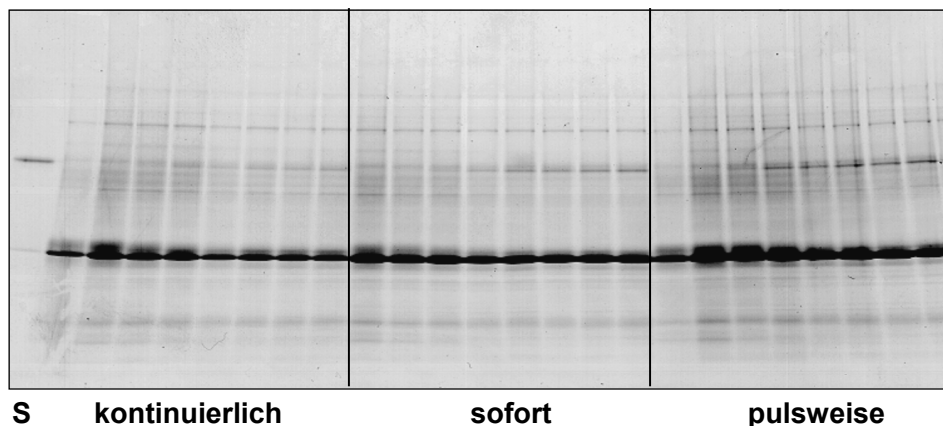


Abbildung 4.19: Variation der Proteinzugabeart

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; colloidale Coomassie®-Färbung; lösliche Proteine; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; S: 0,3345 µg rML-Standard; kontinuierliche Zugabe (Pumpe: 6 mL über 10 h in 200mL Rückfaltungspuffer II); direkte Zugabe (sofort): gesamte Proteinlösung auf einmal dazupipettiert; pulsweise Zugabe: alle 15 min wurden 150 µL Proteinlösung dazugegeben; zeitlicher Verlauf: 5 h, 10 h, 25 h, 50, 75 h, 100 h, 125 h und 145 h

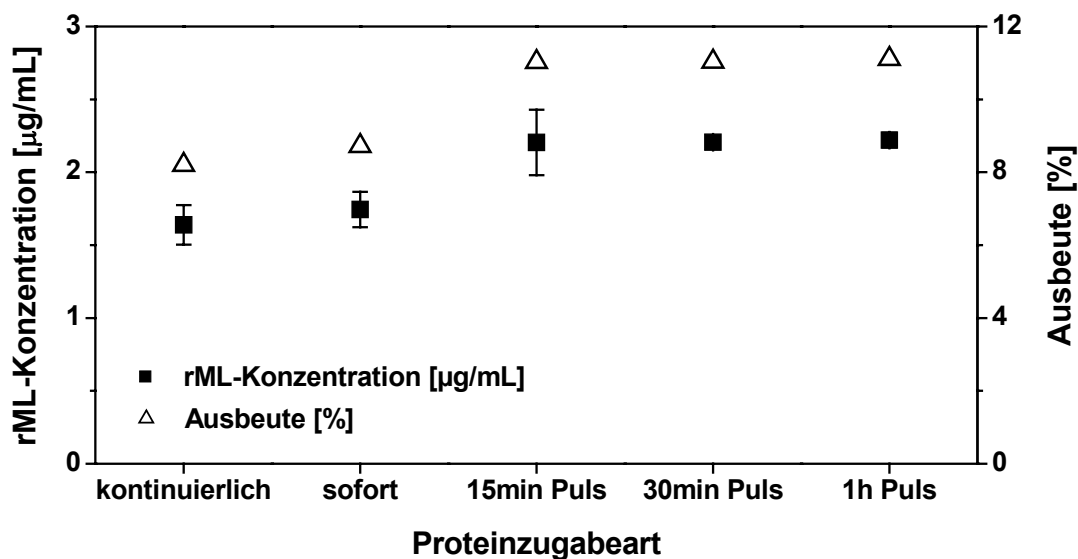


Abbildung 4.20: Proteinzugabeart

20 µg /mL Gesamtproteinkonzentration; rML-Endkonzentrationen nach 145h; Mittelwerte aus drei Experimenten

In Kapitel 4.3.2 wurde darauf hingewiesen, dass ein Großteil der Proteine zu Beginn des Prozesses ausfällt und so nicht für die Reaktion zur Verfügung steht. Daher ist eine pulsweise Zuführung der Proteine in das System hinsichtlich der Verfügbarkeit der löslichen Proteine geeigneter. So kann ein Teil sich falten und neu hinzugefügte Proteine haben die Möglichkeit, schon mit richtig gefalteten abzureagieren. Besonders in Bezug auf das rMLB hat dieses einen Vorteil. rMLB liegt zu Beginn in den unterschiedlichsten Disulfid-verbrückten Isomeren und Polymeren und erst später (ca. 45 h) als eine Struktur vor (Abb. 4.11, S. 68). Aus diesem Grund wurde in einem späteren Experiment das rMLB vorgelegt. Es wurde 45 h vor dem rMLA in den Reaktionsansatz gegeben. In einem Parallelansatz wurde vor Zugabe der rMLA-Kette noch einmal erneut ein Redoxsystem hinzugefügt und so annäherungsweise auf den Anfangswert zurückgesetzt. Dieser Reaktionsansatz und der Ansatz mit gemeinsamer Zugabe der Ketten hatten dementsprechend ungefähr den gleichen Startwert (Abb. 4.21, S. 77). Hier ist zu beobachten, dass das Redoxpotential nach Zugabe der Proteinlösung stark abnimmt und dann wieder langsam zunimmt (rote Kurve), was zum größten Teil durch den Sauerstoffeintrag während der Probeentnahmen verursacht wurde (eingezeichnete Peaks in den Diagrammen).

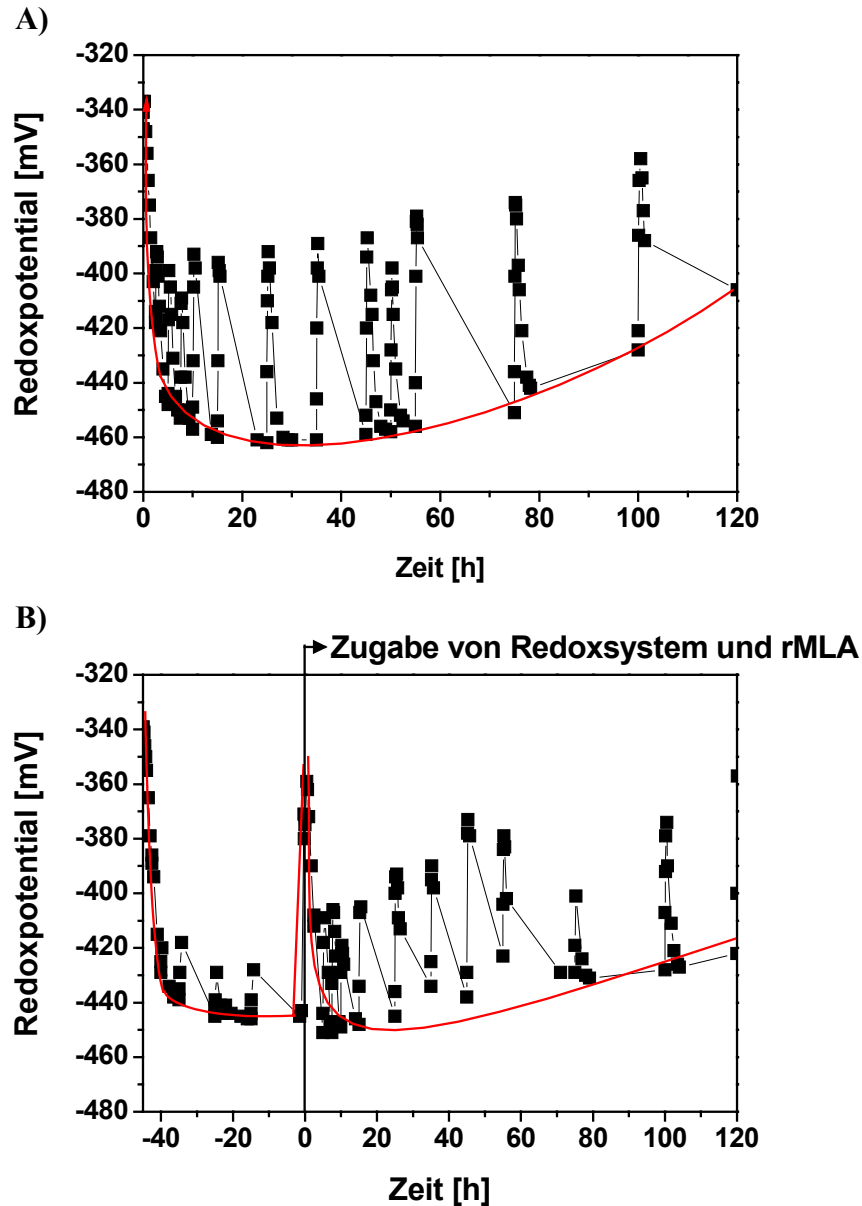


Abbildung 4.21: Redoxpotential während eines Rückfaltungsexperimentes

A: Reaktionsansatz mit gleichzeitiger Zugabe der Ketten; B: 45 h rMLB vorgelegt, zur Stunde 0 Redoxsystem nachgegeben und anschließend rMLA hinzugefügt; rote Kurve: Redoxpotentialverlauf

Die in Abbildung 4.21 gezeigten Redoxpotentiale zeigen die gleiche Tendenz, steigen aber unterschiedlich schnell. Da die Stickstoffzuführung immer gleich eingestellt wurde, können die verschiedenen Potentiale sowohl durch den Sauerstoffeintrag bei der Probenahme als auch durch systemeigene Fehler (Druckschwankungen) entstanden sein. Das Redoxpotential konnte nicht für alle Experimente quantifiziert werden.

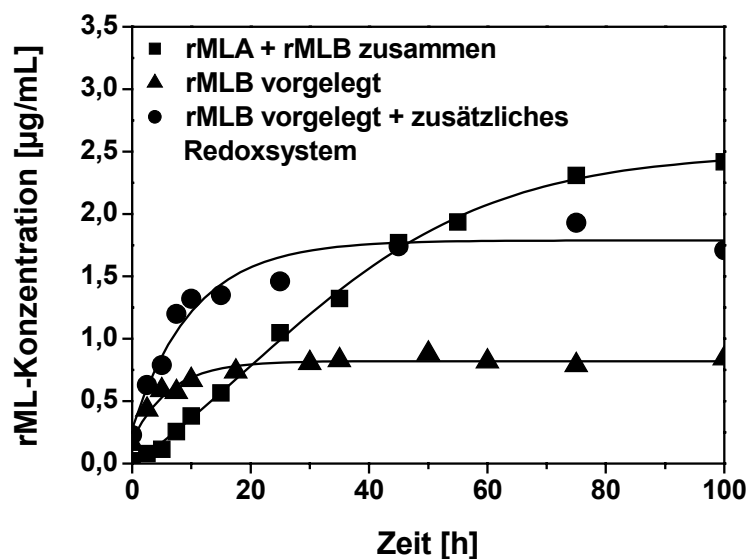


Abbildung 4.22: Vorlage des rMLB

Die rMLB-Kette wurde 45 h vor der rMLA-Kette in den Reaktionsansatz gegeben; Kinetikaufnahme über 100 h; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration

Wie in Abbildung 4.22 dargestellt ist, reagiert die rMLA-Kette bei einer verzögerten Zugabe schneller mit der rMLB-Kette, und die Produktbildung ist nach 10 – 20 Stunden abgeschlossen. Gibt man vor der Zuführung der rMLA-Kette erneut ein Redoxsystem in den Ansatz, so entsteht die doppelte Konzentration des Dimers in der gleichen Zeit. Über einen längeren Zeitraum gesehen wird jedoch bei dem Reaktionsansatz mit gemeinsam zugeführten Ketten mehr produziert. Es ist klar zu erkennen, dass das Redoxsystem ein limitierender Faktor ist. Ein bestimmtes Verhältnis von Reduktions- zu Oxidationsmittel muss vorhanden sein, damit die Disulfidbindungen gebildet werden können. Bei der Bildung von rML ist der Verhältnisbereich sehr begrenzt. Daraus könnte man schließen, dass bei Konstanthaltung eines Redoxpotentials, die gelöste, korrekt gefaltete rMLB-Kette soweit abreagieren kann, wie sie vorhanden ist. Damit wird diese zum limitierenden Faktor, welches eventuell durch Zugabe von weiterer, zuvor gefalteter rMLB-Kette behoben werden könnte, bis schließlich kein reaktionsfähiges rMLA mehr vorhanden wäre. Ebenfalls könnte man bei einer Konstanthaltung des Redoxsystems diese Annahme auf den Ansatz mit den gemeinsam zugefügten Ketten übertragen. Eine solche Tendenz konnte ermittelt werden (Daten hier nicht gezeigt).

Eine höhere Konzentration der rMLB-Kette vorzulegen ist in sofern nicht sehr effektiv, da die rMLB-Kette nur zu einem geringen Anteil in Lösung bleibt (Abb. 4.10, S. 68). Die Zugabe denaturierter Proteine sollte langsamer sein als der die Faltungsgeschwindigkeit

bestimmende Schritt, wodurch die Anhäufung von Intermediaten, die zur Aggregation neigen, vermieden wird [Katoh and Katoh 2000, Vallejo and Rinas 2004a]. Die Faltung des rMLB ist hier der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dementsprechend würde sich für zukünftige Arbeiten eine Untersuchung einer weiteren Zugabe von schon gefaltetem rMLB anbieten. Eventuell könnte das rMLB auch sehr langsam zudosiert werden, so dass es nicht gleich ausfällt und Aggregate bilden kann. Dazu müsste ebenfalls die Zugabe von Redoxmittel optimiert werden.

4.3.5 Temperaturoptimierung

Wie schon oben beschrieben, ist das Löslichkeitsverhalten der Proteine stark abhängig von der Prozesstemperatur. Da die Temperatur aber auch einen bedeutenden Einfluss auf die Bildung des Dimers nimmt, wurde versucht ein Optimum zu bestimmen. Eine eindeutige, optimale Temperatur lässt sich nicht genau definieren, da der Analytikfehler, der durch Umpufferung und ELISA-Messung entsteht, größer ist, als der Unterschied der Konzentrationen. Gut zu erkennen ist jedoch, dass bei Temperaturen oberhalb von 10 °C die Bildung von rML stark abnimmt. Hier verursacht die höhere Temperatur eine verstärkte falsche Faltung und somit eine größere Proteinaggregation. Extrem niedrige Temperaturen bei und unterhalb 0 °C wirken sich ebenfalls negativ auf die Produktbildung aus. Obwohl hier die Proteinlöslichkeit am höchsten ist (Abb. 4.23, S. 80), bildet sich nur sehr wenig rML. Wahrscheinlich wird die Aktivierungsenergie, die benötigt wird, die korrekt gefaltete Struktur einzunehmen, zu hoch sein. So wird der energetisch günstigere Zustand nicht erreicht. Im Bereich von 2 – 10 °C liegen die Ausbeuten sehr nah beieinander, so dass in diesem Bereich das Optimum liegen wird. Für die weiterführenden Experimente wurde eine Arbeitstemperatur von 7,5 °C im mittleren Bereich des Temperaturoptimumplateaus gewählt.

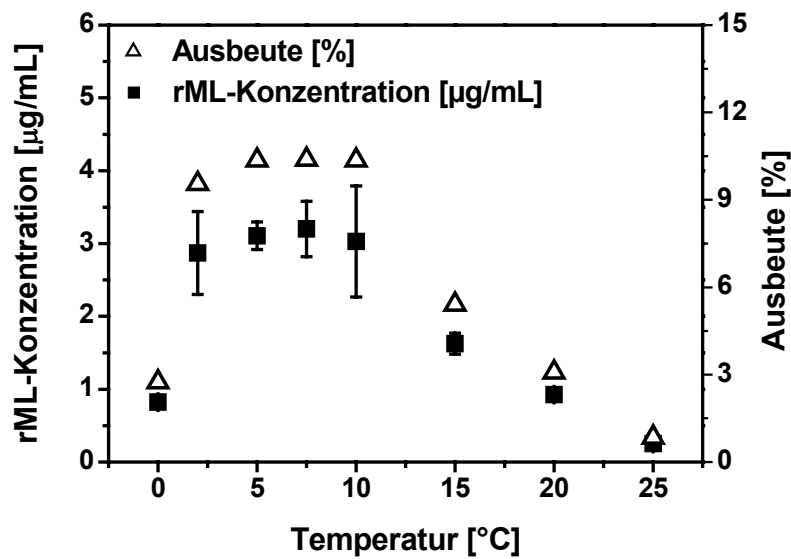


Abbildung 4.23: Bestimmung des Temperaturoptimums im Bereich von 0 – 25°C

Rückfaltungsansätze wurden im Rückfaltungspuffer II durchgeführt; 20 µg/mL Gesamtprotein-konzentration; rML-Endkonzentrationen nach 120 h; Mittelwerte aus drei Experimenten

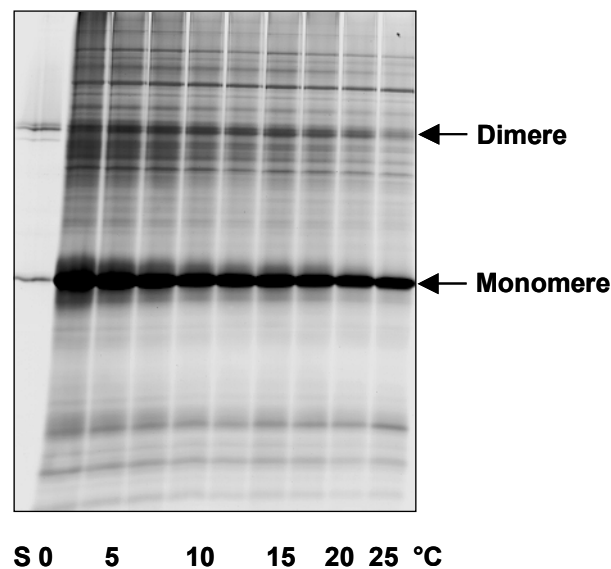


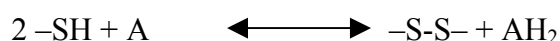
Abbildung 4.24: Proteinlöslichkeit bei verschiedenen Temperaturen

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; Coomassie®-Färbung; lösliche Proteine; S: 0,3345 µg rML-Standard; Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer II; 20 µg/mL Gesamtprotein-konzentration; Endkonzentrationen nach 120 h

In Abbildung 4.24 kann man erkennen, dass die Löslichkeit der Proteine mit Abnahme der Temperatur zunimmt.

4.3.6 Optimierung des Redoxsystems

Die wohl wichtigste Variable bei dieser Rückfaltung ist das Redoxsystem. Eine leichte Störung (z.B. durch Sauerstoff), kann die Renaturierung erheblich beeinflussen. In Kapitel 4.3.4 wurde schon darauf hingewiesen, welche Auswirkungen das Redoxsystem auf die Reaktion hat. Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen erhält man durch Thiole (RS^- und RSSR) mit niedrigem Molekulargewicht. Bei einer schnell reversiblen Thiol/Disulfid-Bindung kann das Gleichgewicht zu dem reduzierten oder oxidierten Zustand des Proteins durch eine Konzentrationserhöhung von RS^- oder RSSR verstärkt werden. Um zufällige Oxidationen von Thiolen durch molekularen Sauerstoff zu vermeiden, sollte EDTA dem Rückfaltungspuffer beigefügt werden. Weiterhin sollte bei längeren Inkubationszeiten Luft entfernt werden (z.B. durch Begasung mit Stickstoff), insbesondere bei neutralen und alkalischen pH-Werten. Die Redoxsysteme erhöhen sowohl die Rate als auch die Ausbeute der Rückfaltung durch das Vereinfachen der Umbildung von inkorrekten Disulfidbindungen [Jänicke and Rudolph 1990]. Die Stabilität von Disulfidbindungen ist abhängig von ihrer Umgebung und der Proteinstruktur. Das Gleichgewicht zwischen Thiol und Disulfid und die Stabilität wird bestimmt durch das Redoxsystem der Umgebung, welches das Redoxpotential bestimmt. Die Bindung und der Bruch der Disulfide erfordern einen passenden Elektronenakzeptor (A) und -donor (AH_2):



Nur in Gegenwart von Redoxreagenzien können Disulfide schnell geformt, gebrochen oder rearrangiert werden. Die Halbwertszeit der Rearrangements von Disulfidbindungen in Anwesenheit von 10^{-4} M Thiolen beträgt 11 min. Intramolekulare Rearrangements, wie in Proteinen mit beiden Thiolen und Disulfiden, können um die 10^{-6} s schnell sein [Creighton 1990].

Die ersten Experimente wurden mit Glutathion GSH/GSSG 2:1 6 mM durchgeführt, da Glutathion gewöhnlich das Redoxsystem der ersten Wahl ist (zelleigenes Redoxsystem). Von dem ursprünglichen Prozess ausgehend (Abb. 4.7, S. 64), bei dem Cystein/Cystin 10:1 11 mM verwendet wurde, wurde überprüft, ob Glutathion oder das wesentlich günstigere Cystein/Cystin-Gemisch das geeignetere Redoxsystem ist. Bei dem Vergleich von GSH/GSSG 2:1 6 mM mit Cystein/Cystin 10:1 11 mM stellte sich heraus, dass die Ausbeuten sehr nah beieinander liegen, weshalb das wesentlich kostengünstigere Cystein/Cystin-Redoxsystem eingesetzt wurde. In Anbetracht des zuvor erwähnten Analytikfehlers

ist die höchste gemessene Produktkonzentration bei einem Redoxsystem Cystein/Cystin 5:1 6 mM zu verzeichnen (Abb. 4.25), mit dem in anschließenden Versuchen weitergearbeitet wurde. Die Molarität der Cystein/Cystin-Redoxsysteme setzt sich aus der Summe der Molarität der einzelnen Komponenten zusammen (z.B. 5:1 entspricht 5 mM:1 mM). Zu erkennen ist die Abnahme der rML-Bildung bei einem reduzierenden Redoxsystem größer einem Verhältnis von 10 red:1 ox. Es wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der Molarität sich negativ auf die Dimerisierung auswirkt, welches hier nicht dargestellt ist.

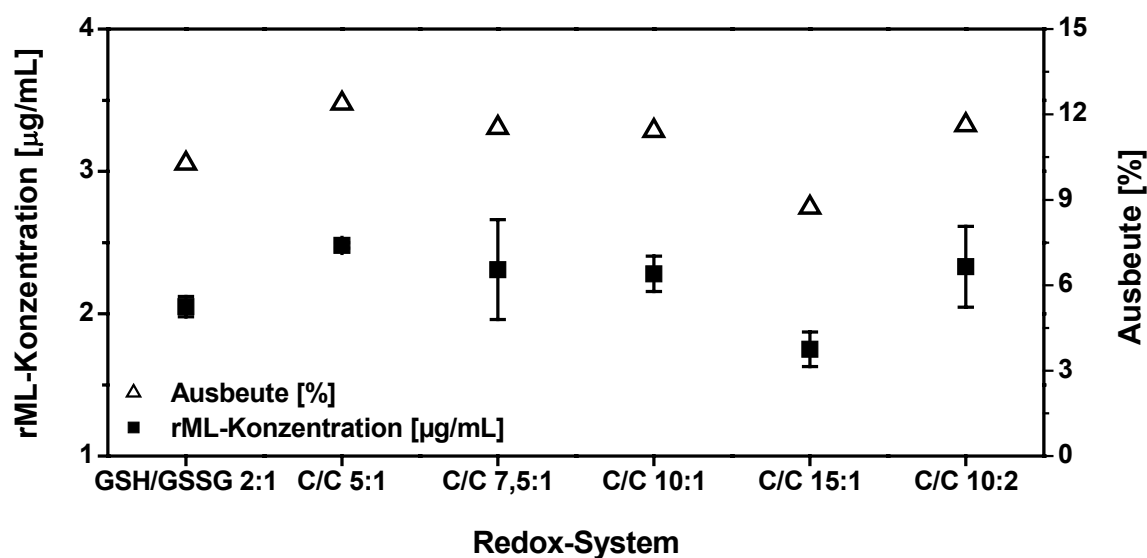


Abbildung 4.25: Bestimmung des Redoxsystems

Rückfaltungspuffer III; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; rML-Endkonzentration nach 120 h; GSH/GSSG: Glutathion red:ox 2:1 (6 mM), C/C: Cystein/Cystin; die Molarität der Cystein/Cystin-Redoxsysteme setzt sich aus der Summe der Molarität der einzelnen Komponenten zusammen (z.B. 5:1 entspricht 5 mM:1 mM; 10:2 entspricht 10 mM:2 mM); Mittelwerte aus zwei Experimenten

4.3.7 pH-Wert-Optimierung

Der pH-Wert beeinflusst die Ladung von Proteinen und das Redoxsystem; isoelektrische Bedingungen sollten bei Rückfaltungsexperimenten vermieden werden. Die pH-Bedingungen müssen im Bereich der Stabilität des Proteins liegen. Die reaktiven Komponenten in der Thiol/Disulfid-Austauschreaktion sind die Thiolatanionen (RS^-). Die meisten Thiole haben einen pK -Wert zwischen 8 und 9, so dass sie am besten im alkalischen pH-Wert reagieren. Reduzierte Proteine bleiben bei niedrigeren pH-Werten erhalten, da hier eine Disulfidbildung aufgrund der Protonen erschwert wird. Bei Proteinen, die freie $-SH$ -Gruppen und Disulfidbindungen enthalten, können Disulfid-Austauschreaktionen stattfinden, die zu irreversiblen Bindungen führen können. Diese Austauschreaktionen können durch

Arbeiten bei niedrigen pH-Wert minimiert werden [Jänicke and Rudolph, 1990].

Um die gelösten Inclusion Bodies reduziert zu halten, wird der Verdünnungspuffer auf pH 6 eingestellt. Um einen optimalen pH-Wert zu bestimmen, wurde zunächst das Phosphatpuffersystem im Rückfaltungspuffer II durch 100 mM Tris ersetzt (Rückfaltungspuffer III), da der Natriumphosphatpuffer keine ausreichende Pufferung bietet. Bei einem bei Raumtemperatur eingestellten pH-Wert von 7,5 des Rückfaltungspuffers III und einem Redoxsystem C/C 5:1 (siehe oben) werden die höchsten Ausbeuten erzielt. Hier wurden über 4 µg/mL rML erreicht (das entspricht ca. 20 % Ausbeute bei einer eingesetzten Konzentration von 20 µg/mL). In Abbildung 4.26 ist zu beobachten, dass ab einem pH-Wert von über 9 fast kein rML mehr gebildet wird. Auch die Löslichkeit scheint um den pH-Wert von 7,5 am höchsten zu sein.

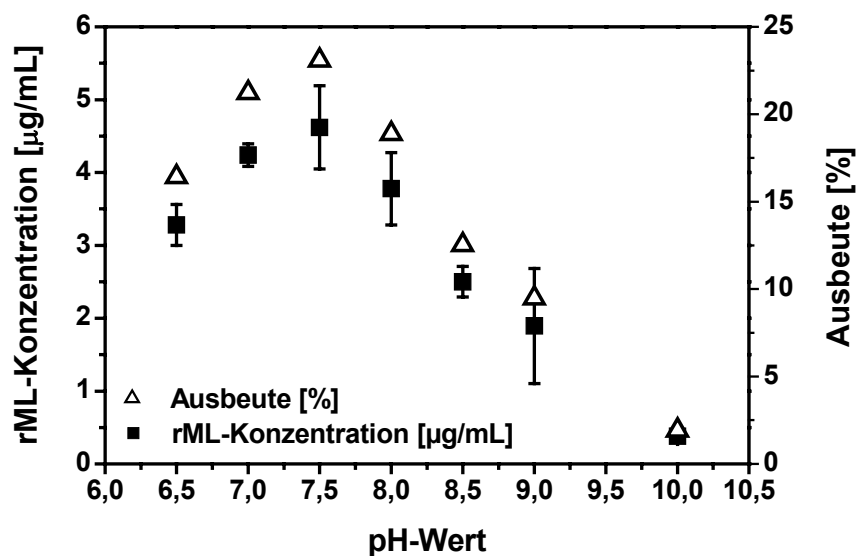


Abbildung 4.26: Bestimmung des pH-Wert-Optimums im Bereich 6,5 – 10

Rückfaltungsexperimente wurden im Rückfaltungspuffer III mit einem Redoxsystem Cystein/Cystin 5:1 durchgeführt; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; rML-Endkonzentrationen nach 120 h; Mittelwerte aus zwei Experimenten

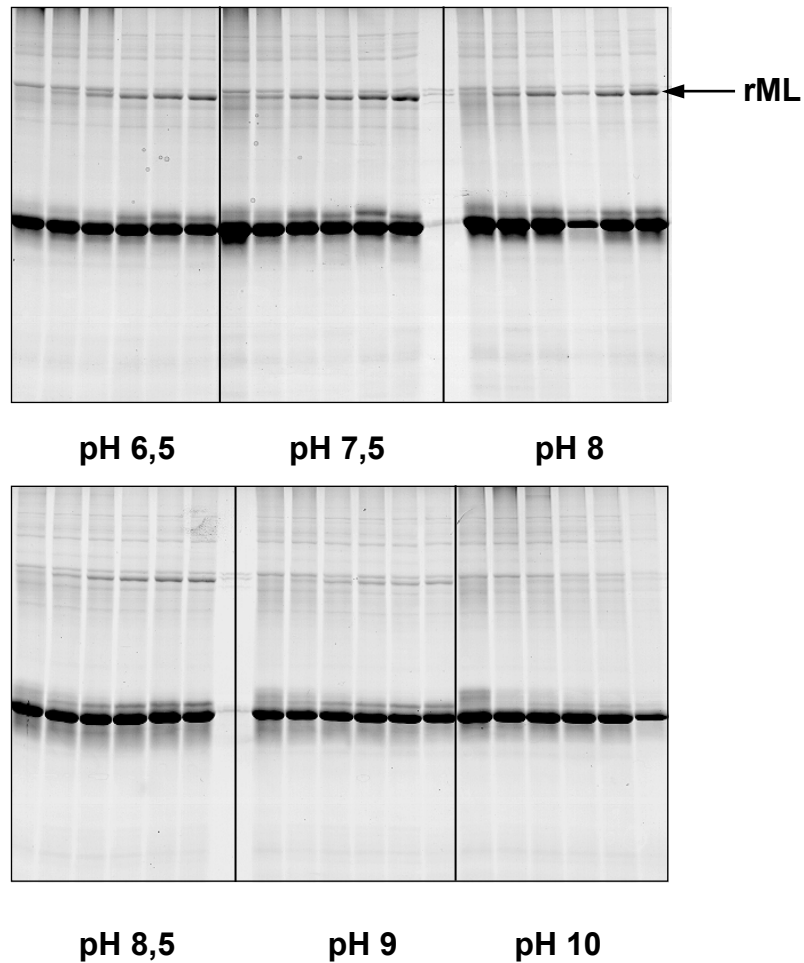


Abbildung 4.27: Bestimmung des pH-Wert-Optimums

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; colloidale Coomassie®-Färbung; Rückfaltungspuffer III; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; lösliche Proteine; zeitlicher Verlauf (10 h, 25 h, 50 h, 75 h, 100 h und 120 h)

4.3.8 Optimierung durch Mutation?

Ein Augenmerk der Firma Viscum AG war es, den Prozess durch Beseitigung der freien Cysteine zu verbessern.

Das C^α-Atom der Cysteine muss 4 – 9 Å auseinander liegen, um eine Disulfidbindung eingehen zu können. Es werden nur eine limitierte Zahl von Konformationen der halben Cystine in Disulfidbindungen gefunden [Creighton 1990, Thornton 1981].

Da die B-Kette zwei freie Cysteine enthält, verkomplizieren diese nicht nur die korrekte Faltung der rMLB-Kette, sondern auch die Dimerisierung. Deshalb wurden die Cysteine durch Mutation entfernt (Austausch der Cysteine durch Serin). Das erhaltene Plasmid wurde in einen *E. coli*-Stamm transformiert, der wiederum das rMLB C21S-C194S (mrMLB) als Inclusion Bodies bildet (Kapitel 4.1). Anhand von Vergleichsexperimenten

kann man sehen, dass diese Veränderung keinen positiven Einfluss auf die Bildung des Dimers hat. Laut Abbildung 4.28 scheint sogar weniger rML gebildet worden zu sein. Dieses Ergebnis kann aber dadurch zustande kommen, dass die mutierte rMLB-Kette eine noch höhere Affinität zur Bindung an Oberflächen und Matrizen hat als das normale rMLB, worauf in Kapitel 4.2.2 eingegangen wurde. Beobachten kann man dieses Verhalten bei einem Western Blot (Abb. 4.29, S. 86). Hier ist die rMLB C21S-C194S-Kette zu einem großen Anteil im Gel zurückgeblieben, während die normale rMLB-Kette fast vollständig auf die Membran übertragen wurde. mrMLB wurde vom monoklonalen Antikörper TB33 ebenso detektiert wie rMLB. Bei der SDS-PAGE in Abbildung 4.30 (S. 86) ist für die Rückfaltung kein großer Unterschied in den Banden der Dimere zu erkennen, welches den Schluss zulässt, dass nicht weniger rML gebildet wurde, sondern ein Teil der Proteine bei der Umpufferung an der Ultrafiltrationsmembran haften geblieben ist. Auch die Monomere reagieren ähnlich dem rMLB in Verlauf und Aggregation (Kapitel 4.3.2). Sie haben ebenfalls ein zerlaufendes Bandenspektrum mit geringfügig weniger Banden, jedoch ist eine etwas stärkere Konzentrierung der Monomerbande zu erkennen. Ein Teil der gelösten Proteine fällt wie bei rMLB über die ersten 20 h verstärkt aus und das Bandenspektrum reduziert sich auf eine Bande (Abb. 4.31, S. 87 und 4.32, S. 87). Die freien Cysteine haben demnach keinen bzw. sehr geringen Einfluss auf die Bildung von rML. Vermutlich liegen sie für eine stabile Disulfidbindung ungünstig.

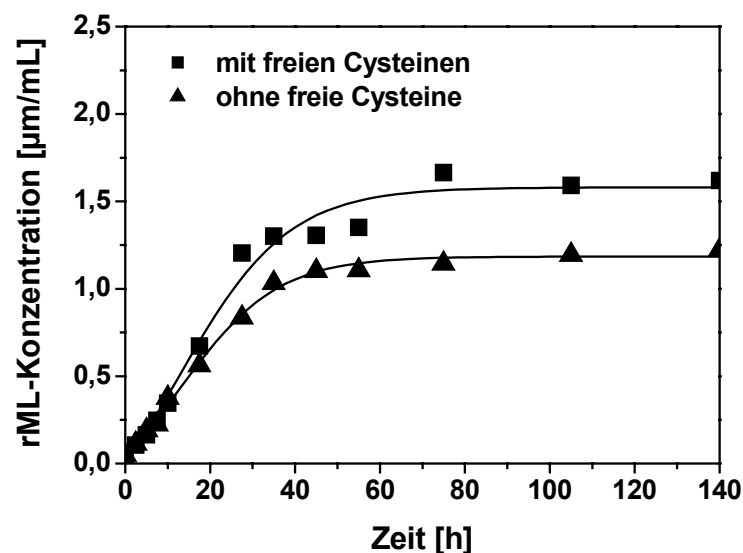


Abbildung 4.28: Vergleich rMLB mit mrMLB; Kinetik

Rückfaltungsexperimente wurden im Rückfaltungspuffer III durchgeführt; 7,5 °C, pH 7,5 und C/C 10:1; 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; Zeitverlauf über 140 h

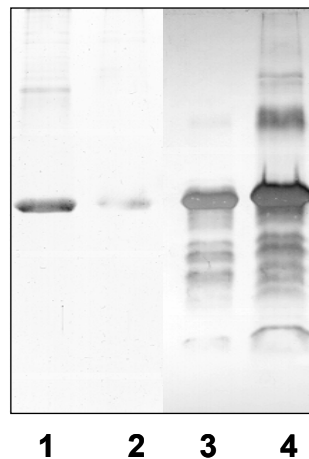


Abbildung 4.29: Vergleich rMLB mit rMLB C21S-C194S im Western Blot

Lösliche Proteine; 1: nicht-reduzierende SDS-PAGE nach dem Western Blot, rMLB C21S-C194S, colloidale Coomassie[®]-Färbung; 2: nicht-reduzierende SDS-PAGE nach dem Western Blot, rMLB, colloidale Coomassie[®]-Färbung; 3: Western Blot von 1, Immunfärbung mit mAK TB33; 4: Western Blot von 2, Immunfärbung mit mAK TB33

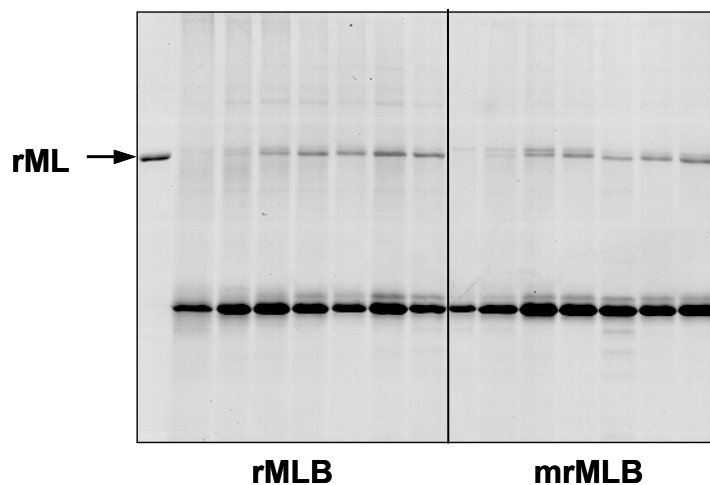


Abbildung 4.30: Vergleich der Produktbildung mit rMLB gegen rMLB C21S-C194S (mrMLB)

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; colloidale Coomassie[®]-Färbung; Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer III mit 20 µg/mL Gesamtproteinkonzentration; lösliche Proteine; zeitlicher Verlauf: 0 h, 10 h, 25 h, 50 h, 75 h, 100 h und 120 h

Im Gegensatz zu den Rückfaltungsansätzen mit der rMLB-Kette, die meist größere Aggregate bildeten, war bei der rMLB C21S-C194S-Kette eine feine milchige Trübung zu beobachten.

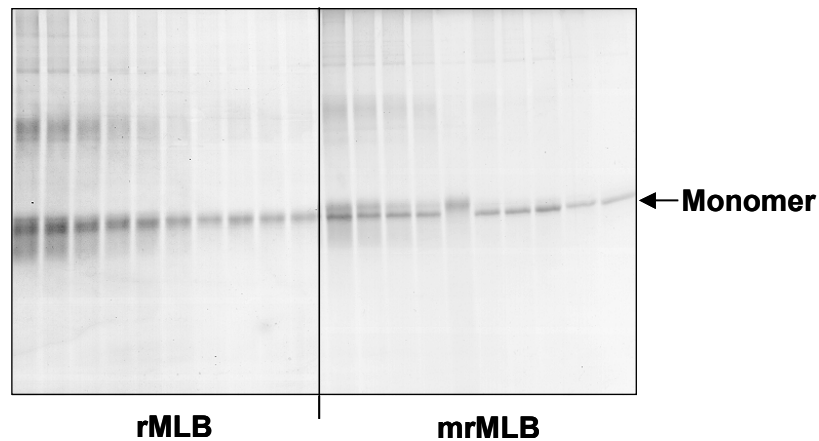


Abbildung 4.31: Vergleich des Bandenspektrums des reinen rMLB-Ansatzes mit dem reinen rMLB C21S-C194S-Ansatz (mrMLB)

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; colloidale Coomassie®-Färbung; Rückfaltungsansatz im Rückfaltungspuffer III mit 30 µg Monomer/mL; lösliche Proteine; Zeitverlauf 0 h, 1 h, 2,5 h, 5 h, 7,5 h, 10 h, 25 h, 35 h, 57,5 h, 80 h und 100 h

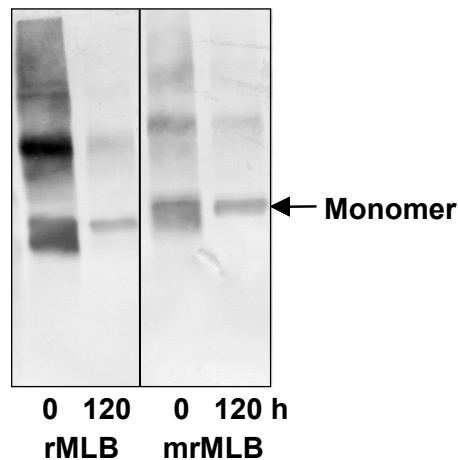


Abbildung 4.32: Vergleich reiner rMLB-Ansatz mit reinem rMLB C21S-C194S-Ansatz (mrMLB), Western Blot

Rückfaltungsansatz der reinen Monomere 30 µg Monomer/mL in Rückfaltungspuffer III; lösliche Proteine; Bandenspektrum bei Zugabe (0 h) und am Ende (120 h); Immunfärbung mit mAK TB33

4.4 Rückfaltungskinetik und Modellierung

Ein Hauptproblem bei Proteinfaltungsexperimenten ist eine kinetische Erfassung der Faltung und der Aggregation verursacht durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen.

Das Löslichkeitsverhalten der Monomere wurde bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben; dabei ist festgestellt worden, dass bei festgelegtem Redoxsystem die Konzentration der rMLB-Kette bestimmend für den Umsatz zum rekombinanten Mistellektin I ist, weil die rMLA-Kette immer in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Für die Aufnahme der Kinetik der Rückfaltung wurden sechs Experimente mit jeweils fünf verschiedenen Eduktkonzentrationen (Gesamtproteinkonzentration: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL und 80 µg/mL Gesamtproteinkonzentration, äquivalente Konzentration von rMLA und rMLB) unter gleichen Bedingungen (optimierte Bedingungen) angesetzt. Die Experimente wurden als Batch-Ansätze durchgeführt, um genaue Aussagen über die einzelnen Komponenten treffen zu können, deren Konzentrationen später mathematisch beschrieben werden.

In Abbildung 4.33 kann man die Bildung des Dimers über die Zeit von 100 h betrachten. Zwei Versuchsreihen sind als Beispiel in Abbildung 4.34 (S. 89) dargestellt.

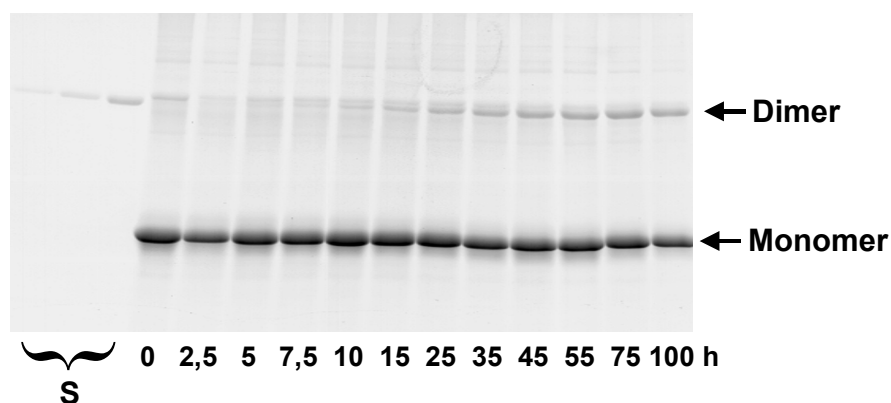


Abbildung 4.33: Beispiel eines Rückfaltungsansatzes eines Kinetikexperimentes

Nicht-reduzierende SDS-PAGE; colloidale Coomassie[®]-Färbung; S: 0,075 µg, 0,15 µg und 0,3 µg rML-Standard; Kinetikaufnahme eines Batch-Rückfaltungsansatzes (Experiment 4, 40 µg/mL Gesamtproteinkonzentration) im Rückfaltungspuffer III (pH 7,5; 7,5 °C; Cystein/Cystin-Redoxsystem 5:1; Zeitverlauf über 100 h)

Die Bildung des rekombinanten Mistellektins ist ein sehr langsamer Prozess, der sich über Tage hinzieht. Sofern man nicht in das System eingreift, das heißt Komponenten oder Bedingungen verändert, wird ab ca. 100 h nur noch geringfügig rML gebildet. In Abbildung 4.34 (S. 89) ist zu erkennen, dass mit Zunahme der Monomerkonzentration die

Ausbeute abnimmt. Bei niedrigeren Konzentrationen werden demnach prozentual mehr Monomere in das Heterodimer umgesetzt. Bei Konzentrationen über 60 $\mu\text{g/mL}$ nimmt die Ausbeute rapide ab (hier nicht dargestellt). Dieses ist auf das Aggregationsverhalten zurückzuführen, da bei einer Erhöhung der Gesamtkonzentration verhältnismäßig weniger Proteine in Lösung bleiben (Kapitel 4.3.2).

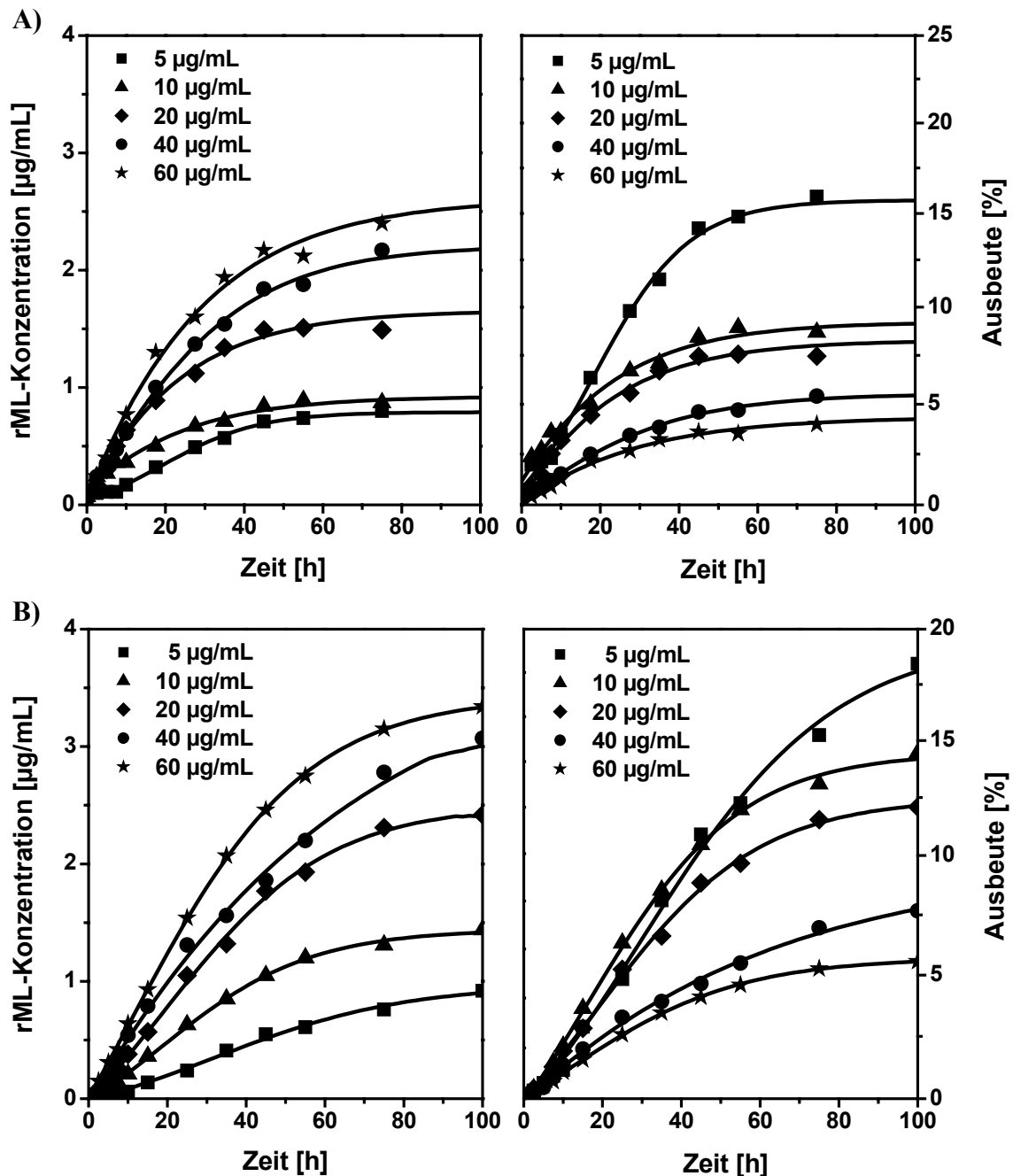


Abbildung 4.34: Beispiele für Kinetikrückfaltungsexperimente

rML-Bildung und Ausbeuten von Batch-Rückfaltungsansätzen im Rückfaltungspuffer III (pH 7,5; 7,5 °C; Cystein/Cystin-Redoxsystem 5:1; 5 – 60 $\mu\text{g/mL}$ Gesamtproteinkonzentration; Zeitverlauf über 100 h): A) Datensatz 2, Gruppe 1; B) Datensatz 4, Gruppe 2

Bei den sechs durchgeführten Experimenten ergaben sich zwei Gruppen, die verschiedene Rückfaltungsverläufe hatten (jeweils drei Experimente). Die Endausbeuten und Verläufe innerhalb dieser zwei Gruppen waren sehr ähnlich. In den Experimenten zur Kinetikaufnahme sind alle Puffer- und Umgebungsbedingungen gleich eingestellt worden. Die Ausgangsbedingungen wurden also als identisch angenommen. Trotzdem sind die Verläufe der rML-Bildung leicht unterschiedlich, das heißt, die Geschwindigkeit der rML-Bildung variiert zum Teil. Dieses ist höchstwahrscheinlich auf das Redoxsystem bzw. die Anwesenheit von Sauerstoff zurückzuführen. Der Sauerstoff stört durch Oxidation das Verhältnis von Reduktions- zu Oxidationsmittel. Diese Parameter konnten nicht ermittelt werden bzw. nicht geregelt werden. In den Kapiteln 4.3.4 und 4.3.6 wurde darauf hingewiesen, wie stark das Redoxpotential das System beeinflusst.

Auch die Proteinzugabeart (Kapitel 4.3.4) besitzt einen Einfluss auf die Kinetik der Produktbildung. Dieses hängt mit der Faltung der rMLB-Kette zusammen (Abb. 4.11, S. 68 und Abb. 4.22, S. 78), die sehr langsam ist. Schon zu Beginn existiert korrekt gefaltetes rMLB, jedoch erst nach einem Zeitraum von ca. 45 h liegt das in Lösung vorliegende rMLB hauptsächlich in der gefalteten Struktur vor. Bei Vorlage von schon vollständig gefalteten rMLB ist ein steiler Anstieg der rML-Bildung zu verzeichnen. Hier reagieren die reaktionsfähigen rMLB-Monomere (B_i) relativ schnell (10 – 20 h bis Reaktionsende) mit den reaktionsfähigen rMLA-Monomeren (A). Das spricht dafür, dass das rMLB tatsächlich die gefaltete Struktur aufweist und dass rMLA keine langlebigen Intermediate bildet. rMLA wird bei der erneuten Zugabe vom Redoxsystem (Abb. 4.22, S. 78) solange zusammen mit rMLB in das Dimer umgewandelt bis kein reaktionsfähiges rMLB mehr zur Verfügung steht. Der Hauptanteil der gelösten rMLA-Kette scheint demnach als das reaktionsfähige rMLA (A) vorzuliegen und nur ein kleiner Anteil als reaktionsunfähiges rMLA (A_x) zu existieren. Die Faltung von rMLA hat keinen Einfluss auf die Kinetik. Die Reaktion der rML-Bildung ist bei einer Vorlage von rMLB nur noch von der Konzentration und der Assoziation der Monomere (A und B_i) abhängig.

Wie schon in Kapitel 4.3.2.1 erwähnt, nimmt die rMLB-Kette verschiedene Strukturen an, wovon der Hauptteil der Proteine ausfällt. Wie viele Zwischenschritte bis zu dem reaktionsfähigen rMLB (B_i) durchlaufen werden und an welchen Stellen die unlöslichen rMLB (B_u) und eventuell vorhandenen löslichen, reaktionsunfähigen rMLB (B_x) abgehen, konnte nicht ermittelt werden. Ein geringer Teil richtig gefaltetes rMLB (B_i) muss von Anfang an vorhanden sein, da schon in den ersten Minuten das Dimer gebildet wird. Der Prozess der Faltung zum korrekt gefalteten, reaktionsfähigen rMLB kann also nicht ausreichend

bestimmt werden. Durch die neun Cysteine ergeben sich zu viele Kombinationsmöglichkeiten zur Bildung von Disulfidbindungen, um sie erfassen zu können.

Die Abhängigkeit von der Konzentration in einem Modell zusammenzufassen ist nur bedingt möglich, da die Stickstoffzuführung bzw. die Sauerstoffkonzentration und damit die Auswirkungen des Redoxpotentials nicht quantitativ bestimmt werden konnten. Da auch die Intermediate der rMLB-Kette nicht quantifiziert werden konnten, ist ein vereinfachtes Modell angestrebt worden.

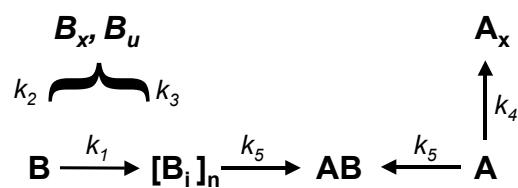
Da die Konzentrationsunterschiede der in die Modellierung aufgenommenen Komponenten sehr groß waren, wurden verschiedene Wichtungen der Parameter (Wichtungen: B_u :1; A_x : 2; B_i : 4; AB : 10) vorgenommen.

In die Modellerstellung wurde das Homodimer nicht mit einbezogen, da dieses schon vor der Renaturierung vorhanden ist.

Es wurden verschiedene Modelle formuliert, die annäherungsweise die experimentell ermittelten Daten wiedergeben. Das System wird als ein geschlossenes System behandelt.

Wie schon erwähnt, lassen sich die rMLB-Intermediate nicht bestimmen, so dass nur maximal zwei Zwischenschritte vom reduzierten B zum reaktionsfähigen rMLB (B_i) in das Modell mit einbezogen wurden.

Die grundlegende Modellstruktur zeigt die folgende Reaktionsgleichung:



(M 0)

AB = rML

B = rMLB direkt nach Zugabe in den Rückfaltungspuffer

B_x = lösliches reaktionsunfähiges rMLB

B_u = unlösliches rMLB

B_i = reaktionsfähiges Intermediat von rMLB

A = reaktionsfähiges rMLA, direkt nach Zugabe in den Rückfaltungspuffer

A_x = lösliches reaktionsunfähiges rMLA

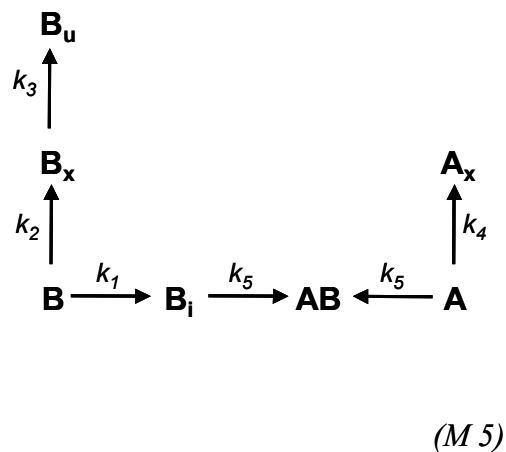
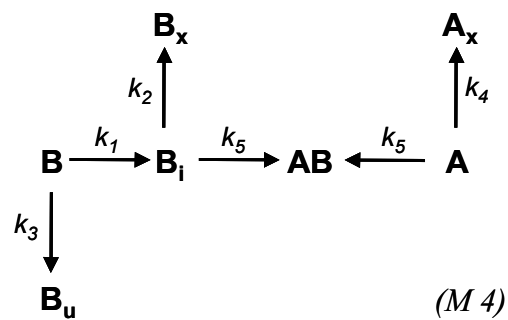
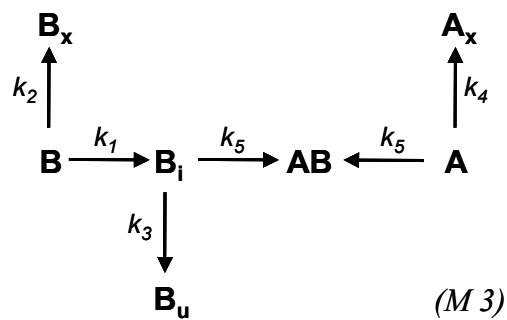
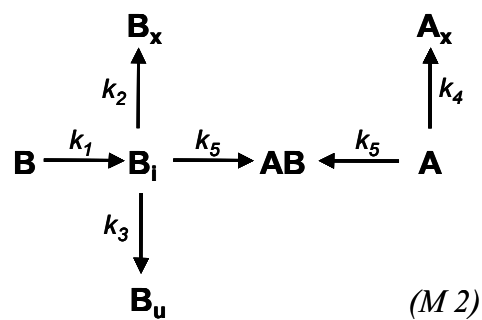
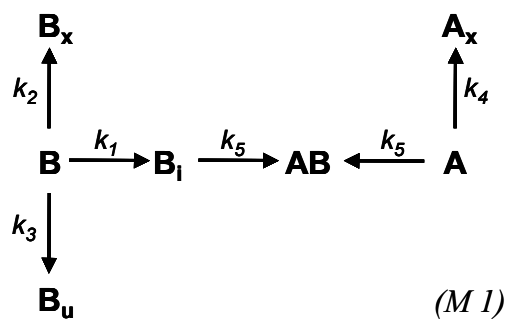
k_x = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (x: 1-5)

Da der Hauptteil der unlöslichen rMLA-Kette (A_u) sofort nach Zugabe der Proteine ausfällt (Abb. 4.8, S. 66), wurde die Bildung des unlöslichen rMLA nicht in die Modellierung aufgenommen.

Folgende Modelle wurden getestet:

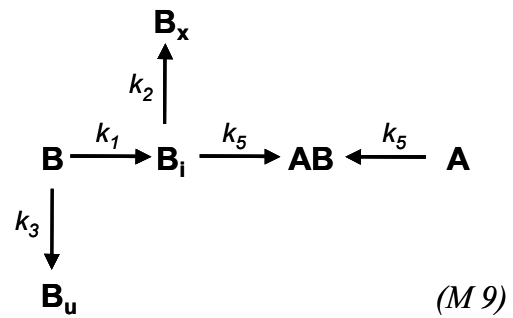
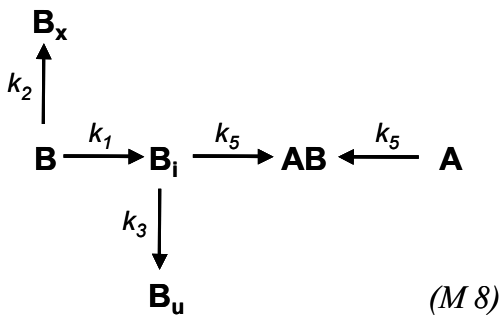
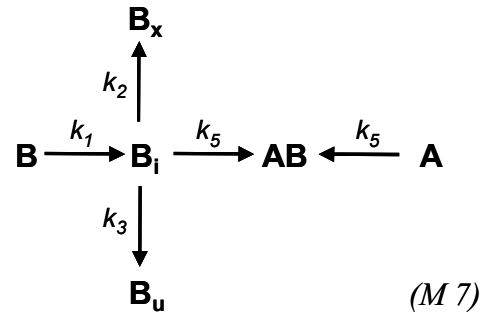
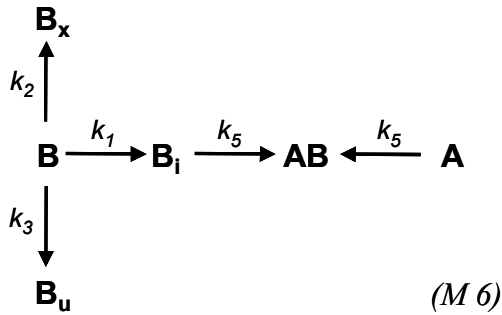
Modell 1 – 5:

Es wird nur ein rMLB-Intermediat angenommen.



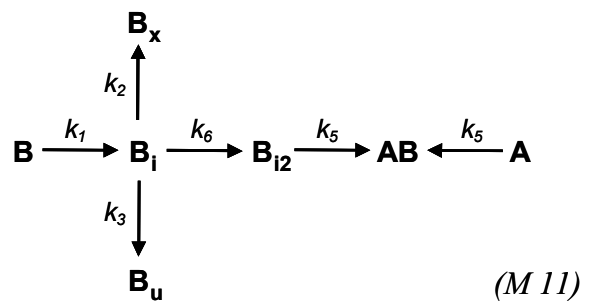
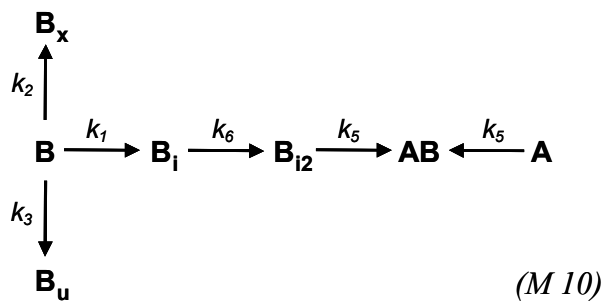
Modell 6 – 9

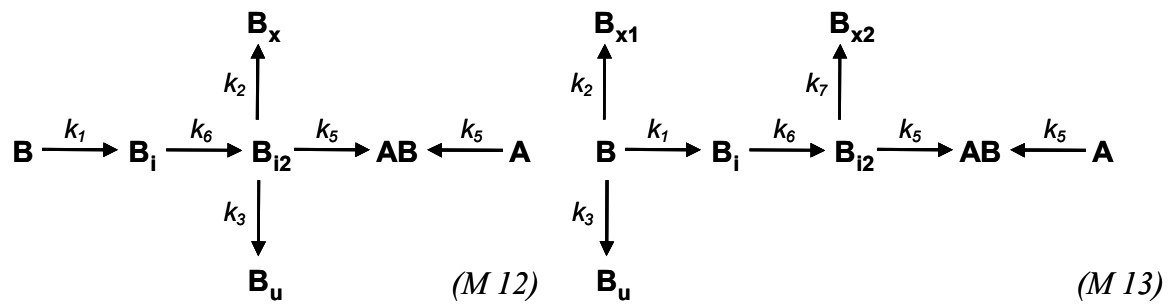
Der geringe Anteil an A_x wird in folgenden Modellen vernachlässigt. Es wird nur ein rMLB-Intermediat angenommen.



Modell 10 – 13:

Ein zweites rMLB-Intermediat wird angenommen.





Modell 14 – 17:

Ein geschwindigkeitsbestimmender Einfluss von rMLA wird ausgeschlossen.

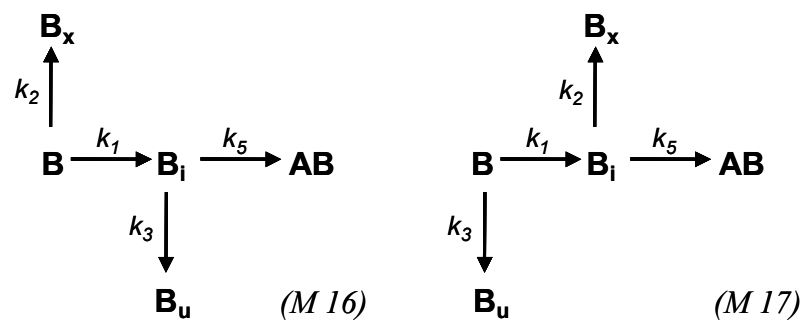
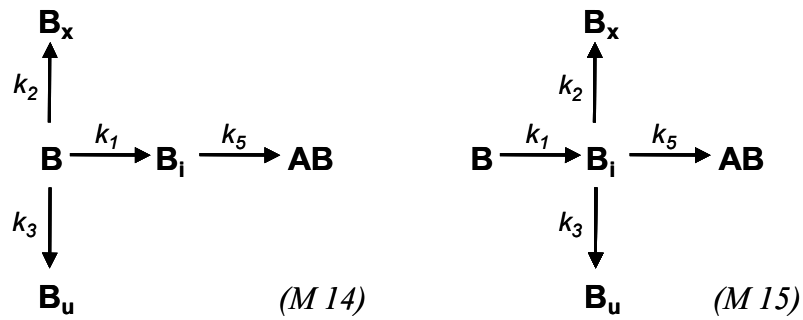


Tabelle 4.2: Eingesetzte Reaktionsordnungen, M1 – M5

Modell	Anpassung	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5
M1	1	1	1	1	1	2
	2	0	1	n	1	2
	3	1	n	1	1	2
	4	1	n	n	1	2
	5	0	n	1	1	2
M2	1	1	1	1	1	2
	2	0	1	1	1	2
	3	1	n	1	1	2
M3	1	1	n	1	1	2
M4	1	1	n	1	1	2
M5	1	1	1	1	1	2
	2	0	1	1	1	2
	3	1	n	1	1	2

Tabelle 4.3: Eingesetzte Reaktionsordnungen, M6 – M9

Modell	Anpassung	k_1	k_2	k_3	k_5
M6	1	1	n	1	2
M7	1	1	n	1	2
M8	1	1	n	1	2
M9	1	1	n	1	2

Tabelle 4.4: Eingesetzte Reaktionsordnungen, M10 – M13

Modell	Anpassung	k_1	k_2	k_3	k_5	k_6	k_7
M10	1	1	n	1	2	1	-
	2	1	n	n	2	1	-
	3	0	n	1	2	1	-
M11	1	1	n	1	2	1	-
	2	1	n	n	2	1	-
M12	1	1	n	1	2	1	-
M13	1	1	1	1	2	1	1
	2	1	n	1	2	1	1
	3	1	n	n	2	1	1

Tabelle 4.5: Eingesetzte Reaktionsordnungen, M14 – M17

Modell	Anpassung	k_1	k_2	k_3	k_5
M14	1	1	1	1	1
	2	1	n	1	1
M15	1	1	1	1	1
	2	1	n	1	1
M16	1	1	1	1	1
	2	1	n	1	1
M17	1	1	1	1	1
	2	1	n	1	1

Für die Bildung von B_x , B_u und B_i wurden verschiedene Reaktionsordnungen eingesetzt. Es wurden vier Hauptvarianten untersucht, bei denen B_x und B_u von verschiedenen Positionen abgehen. Verglichen wurden die berechneten Residuen (hier nicht dargestellt). Diese basieren auf der Summe der gewichteten Abweichungsquadrate zwischen Modell und Messwerten und sind damit ein Maß der Güte der Anpassung. Je kleiner der Wert ist, desto besser ist die Anpassung.

Alle Anpassungen zeigen ein gemeinsames Verhalten und ähnlich große Abweichungen. Bei kleinen Ausgangskonzentrationen beschreiben die Modelle zu geringe Produktbildungen. Je nach Modellvariante wird die rML-Bildung erst zwischen der zweit- und viert-höchsten Konzentration annähernd an die experimentellen Daten angepasst. Die Konzentrationsabhängigkeit kann also nicht für den gesamten Bereich beschrieben werden.

Sowohl der Analytikfehler von ungefähr 10 – 20 % (Proteinausfällung, Konzentrationsbestimmung mit Quantiscan (BIOSOFT[®], Großbritannien), Umpufferung und ELISA) als auch der immense Einfluss des Redoxpotentials auf das empfindliche Rückfaltungssystem erschweren die korrekte mathematische Bestimmung eines Modells. Die Anzahl der nicht zu quantifizierenden Zwischenprodukte des rMLB können auch durch die Modellierung nicht aufgeklärt werden. Die Anpassungen der verschiedenen Positionen der abgehenden B_x und B_u haben nur geringfügig unterschiedliche Residuen. Die Einführung eines zweiten Intermediates zeigt keine Verbesserung der Ergebnisse.

Ausgegangen wurde davon, dass die rMLA-Kette sich sehr schnell faltet und in lösliches, reaktionsfähiges rMLA (A) und unlösliches rMLA (A_u) trennt, weshalb die Bildung von A_u hier nicht in die Modellierung aufgenommen wurde. Das reaktionsunfähige rMLA

(A_x) aus der mathematischen Betrachtung zu lassen, ergab nur eine minimale Änderung, so dass das Entfallen dieses Reaktionsschrittes keine negative Auswirkung auf die Anpassungsgüte hat. Die rML-Bildung ganz unabhängig von rMLA zu behandeln, zeigt eine geringe Änderung der Anpassungsgüte, die je nach Modellvariante eher zu einer schlechteren Anpassung führt. Daher wurde dieser Schritt im Modell beibehalten. Die unvollständige Abdeckung des Konzentrationsbereiches bleibt jedoch bestehen.

Die Modellierung hat gezeigt, dass einzelne Messreihen gut anpassbar sind, jedoch konnten Messreihen eines Experimentes mit unterschiedlichen Startkonzentrationen mit einem Parametersatz nur bedingt beschrieben werden. Insbesondere die Messreihe mit der geringsten Konzentration (5 $\mu\text{g/mL}$) zeigte die größten Abweichungen von den Messdaten. Diese lässt sich zwar als Einzelansatz, aber nicht zusammen mit den anderen Konzentrationen anpassen. Einige Modelle stellen die Messdaten ab der zweitniedrigsten Ausgangskonzentration relativ gut dar. Um diese Konzentrationsabhängigkeit zu untersuchen, wurden einzelne Reaktionen als n . Ordnung angesetzt und es wurde getestet, ob die Reaktion von B zu B_i (k_1) 0. Ordnung eine Verbesserung erbringt. Bei einer solchen von der Konzentration der Reaktanden unabhängigen Reaktion lassen sich die Messdaten gar nicht anpassen (Darstellungen in Kapitel 7.3, Anhang). Bei einer Reaktion n . Ordnung der Bildung zum B_u (k_3) ergibt sich keine Besserung der Anpassung. Die meisten Simulationen wurden mit der Reaktion n . Ordnung für die Bildung von B_x (k_2) berechnet.

Keines der Modelle kann die Konzentrationsabhängigkeit zufriedenstellend beschreiben. Wenn man nur die Residuen vergleicht, dann ergibt sich eine Tendenz, dass die Modelle, bei denen B_x und B_u vom B abgehen, durchschnittlich besser sind als die anderen Varianten. Die A_x -Bildung und die Einführung eines zweiten B-Intermediates haben keine große Auswirkung auf die Anpassung, daher reicht für die Systembeschreibung das einfache Modell *M 6*, welches die verschiedenen Datensätze relativ gut widerspiegelt. Mit den eingesetzten Reaktionsordnungen (Reaktionsordnung der rML-Bildung: 2. Ordnung; Bildung von B_x : n . Ordnung; alle anderen Reaktionen: 1. Ordnung; Abb. 4.35, S. 102, weitere Darstellungen in Kapitel 7.3, Anhang) stellt dieses Modell auch graphisch die beste Variante dar. Alle Parameter sind gut bestimmbar. Eine Sensitivitätsanalyse ergab keine linearen Abhängigkeiten.

Dabei ergeben sich folgende Gleichungen und Parameter:

$$\frac{d[A]}{dt} = -r_5 \quad (4.1)$$

$$\frac{d[A_l]}{dt} = -r_5 \quad (4.2)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = -r_1 - r_2 - r_3 \quad (4.3)$$

$$\frac{d[B_l]}{dt} = -r_3 - r_5 \quad (4.4)$$

$$\frac{d[B_i]}{dt} = r_1 - r_5 \quad (4.5)$$

$$\frac{d[B_x]}{dt} = r_2 \quad (4.6)$$

$$\frac{d[B_u]}{dt} = r_3 \quad (4.7)$$

$$\frac{d[AB]}{dt} = r_5 \quad (4.8)$$

mit

$$r_1 = k_1 [B] \quad (4.9)$$

$$r_2 = k_2 [B]^n \quad (4.10)$$

$$r_3 = k_3 [B] \quad (4.11)$$

$$r_5 = k_5 [A][B_i] \quad (4.12)$$

Da A und A_x und ebenso B, B_i und B_x analytisch nicht unterschieden werden konnten, erfolgte die Modellanpassung an die Variablen A_l, B_l, AB und B_u. Diese stehen mit den Modellvariablen in folgendem Zusammenhang:

$$\frac{d[A_l]}{dt} = \frac{d[A]}{dt} + \frac{d[A_x]}{dt} \quad (4.13)$$

und

$$\frac{d[B_l]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} + \frac{d[B_i]}{dt} + \frac{d[B_x]}{dt} \quad (4.14)$$

A_l: lösliches rMLA

B_l: lösliches rMLB

Die Aussagen der vorherigen Kapitel und von Seite 90 beinhalten unter anderem, dass die vollständige Faltung der rMLB-Kette mehrere Stunden benötigt, und wenn es gefaltet vorgelegt wird, relativ schnell mit der rMLA-Kette zum Produkt umgesetzt wird. Die Faltung der rMLB-Kette scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein.

Es entsteht schon in den ersten Minuten das Heterodimer und wird kontinuierlich gebildet, das heißt, dass auch in dem Zeitraum, in dem rMLB noch nicht ausschließlich in einer korrekt gefalteten Struktur vorliegt, gefaltetes rMLB vorhanden ist. Das Gleichgewicht dieser Reaktion wird wahrscheinlich durch Aggregationsreaktionen (Bildung zum B_u) oder andere konkurrierende Reaktionen (Bildung zum B_x) gestört. Wenn das meiste rMLB ausgefallen ist, scheint auch zum Hauptteil diese gefaltete Struktur vorzuliegen.

Das Modell *M 2* mit einer angenommenen Reaktion 0. Ordnung für die Bildung zum B_i zeigt, dass sich damit keine Anpassung durchführen lässt (Abb. 7.3 und 7.4, S. 132; für k_I wurde 1000 s^{-1} eingesetzt, welches einer extrem schnellen Reaktion entspricht und damit konzentrationsunabhängig ist). Der Prozess ist von der Konzentration des rMLB abhängig.

Die Simulationen haben ergeben, dass die besten Anpassungen mit einer Reaktion 2. Ordnung für die Elementarreaktion zur rML-Bildung zu erstellen sind. Man könnte annehmen, dass aufgrund der Aggregation des rMLB und der ausreichend zur Verfügung stehenden rMLA-Kette die rMLA-Konzentration vernachlässigbar wäre und so die rML-Bildung nur durch rMLB bestimmt werden würde. Hier steht jedoch gegenüber, dass die Modelle *M 14–17*, die keine Einwirkung von rMLA enthalten, etwas schlechtere Anpassungen ergaben.

Wenn man davon ausgeht, dass die Gesamtreaktion 1. Ordnung wäre, dürfte kein B_i vorhanden sein, da es sofort abgebaut werden würde, sobald es sich gebildet hätte. Nach Berechnungen des Modell *M 6* liegen minimale Mengen vor; das lässt darauf schließen, dass auch die Reaktion zum rML einen Einfluss auf die Renaturierungsdauer haben muss.

Die errechneten Geschwindigkeitskonstanten liegen im Tagebereich. Das Produktwachstum ist in einem Batch-Rückfaltungsansatz nach ca. 100 h abgeschlossen. Da die Geschwindigkeitskonstanten einer 1. und 2. Ordnung aufgrund der verschiedenen Einheiten nicht mit einander vergleichbar sind, wurde versucht über die Reaktionsgeschwindigkeit eine Gegenüberstellung durchzuführen. Damit sollte eine Tendenz aufgezeigt werden, welcher Faltungsschritt der langsamere ist. Bei einer Annahme, dass bei einer Reaktion 1. Ordnung die Bildung von rML so schnell ist, dass die Konzentration von B_i null entspricht, kann man für diesen Reaktionsschritt die Konzentration von B_i einsetzen. Für eine Reaktion 2. Ordnung ist eine Annahme möglich, dass B_i so schnell zu

B_i abreagiert, dass man es gleichsetzen kann. Dabei würden sich für die sehr vereinfachte Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit (R) folgende Gleichungen ergeben:

$$\text{Für eine Reaktion 1. Ordnung:} \quad R = k_1 \cdot [B_i] \quad (4.15)$$

$$\text{Für eine Reaktion 2. Ordnung:} \quad R = k_5 \cdot [B_i] \cdot [A_i] \quad (4.16)$$

Die ermittelten Werte der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_5 des Modells M_6 wurden in die Gleichungen eingesetzt (Datensatz 2: $k_1 = 4,26 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ und $k_5 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ L nmol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bzw. Datensatz 4: $k_1 = 1,05 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ und $k_5 = 4,94 \cdot 10^{-3} \text{ L nmol}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die berechneten Geschwindigkeiten einer Reaktion 1. Ordnung ergaben je nach Konzentration einen um Faktor 30 – 200 kleineren Wert als die einer Reaktion 2. Ordnung.

Sieht man sich die realen Reaktionsschritte getrennt an, so ist die Bildung von B_i eine Reaktion 1. Ordnung und die Produktbildung eine 2. Ordnung. Es handelt sich um eine Folgereaktion. Beide Wege sind extrem langsame Vorgänge (im Stunden- und Tagebereich). Die vereinfachten Geschwindigkeiten deuten aber darauf hin, dass die Rückfaltung des rMLB mehr Zeit in Anspruch nimmt und damit höchstwahrscheinlich, wie erwartet, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Die Bildung von rML ist jedoch konzentrationsabhängig, so dass sowohl die Rückfaltung des rMLB als auch die Assoziation der Monomere zum Heterodimer die Ursache für die extrem lange Renaturierungsdauer sind.

Aufgrund der Löslichkeitsproblematik und den unbekannten Parametern ist hier eine vereinfachte Darstellung betrachtet worden. Für ein vollständiges, komplexes Modell sind weitere Kinetikexperimente unter reproduzierbaren anaeroben Bedingungen erforderlich, um weitere quantitative Aussagen treffen zu können.

Das rMLB verkompliziert die rML-Renaturierung, weshalb die Intermediatebildung in weiterführenden Arbeiten näher untersucht werden sollte. Das rMLB besitzt eine doppelt dreiblättrige Struktur („ β -trefoil“-Familie), in welcher die β -Faltblätter der Subdomänen sich selbst um eine pseudo-dreigefaltete Achse anordnen. Die korrekt gefaltete rMLB-Kette enthält drei intramolekulare Disulfidbindungen [Mikeska et al. 2005, Sweeney et al. 1998]. In Chavez et al. [2006] wurden Proteine aus der β -dreiblättrigen Familie (z.B. IL-1 β) untersucht, denen man verschiedene Faltungswege zuordnen konnte. Die Faltung von IL-1 β und hFGF ist im Vergleich zu anderen nicht-Disulfid-verbrückten, monomeren Proteinen gleicher Größe langsam (im Minutenbereich); zudem werden Intermediate gebildet [Estopé and Rinas 1999, Varley et al. 1993]. rMLB besteht aus zwei solcher

β -dreiblättrigen Proteineinheiten und ist außerdem durch drei intramolekulare Disulfidbindungen verbunden. Das zeigt, dass die Rückfaltung der rMLB-Kette ein sehr komplexer Prozess sein muss.

Andere Proteine mit gleicher Faltungsproblematik konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Vergleicht man die Faltung des Disulfid-verbrückten Heterodimers des humanen Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF), so liegt die Kinetik in einem ähnlichen Zeitraum (Stunden- bis Tagebereich) [Müller 1998; Müller and Rinas 1999]. Das der Cystinknoten-Familie angehörige Protein besteht ausschließlich aus β -Faltblattstrukturen mit acht Disulfidbindungen (je Monomer drei intramolekulare und zwei intermolekulare Disulfidbindungen). Es hat aber einen vom rML abweichenden Faltungsweg. Aufgrund der Unabhängigkeit von der Monomerkonzentration liegt beim PDGF eine Reaktion 1. Ordnung vor, eine Reaktion 2. Ordnung spielt bei der Faltung keine Rolle. Die Monomere assoziieren sehr schnell und die Ausbildung der Disulfidbindungen bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Es existieren neben dem Heterodimer auch noch zwei Homodimere (PDGF-AA und PDGF-BB). Das PDGF-AB wird jedoch dreimal schneller gebildet [Müller 1998; Müller and Rinas 1999]. Andere Mitglieder der Cystinknotenfamilie wie das Homodimer BMP-2 [Vallejo 2006] verhalten sich ähnlich.

Wie oben beschrieben verläuft die Renaturierung des rML anders. Es ist von der Konzentration der Monomere insbesondere der des rMLB abhängig. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hier die Bildung von korrekt gefalteten rMLB (B_i). Damit lässt sich im Vergleich zu den genannten Proteinen nur zeigen, dass komplexe Dimere, die Disulfidbindungen enthalten, eine sehr langsame Renaturierung über mehrere Stunden bis hin zu Tagen aufweisen.

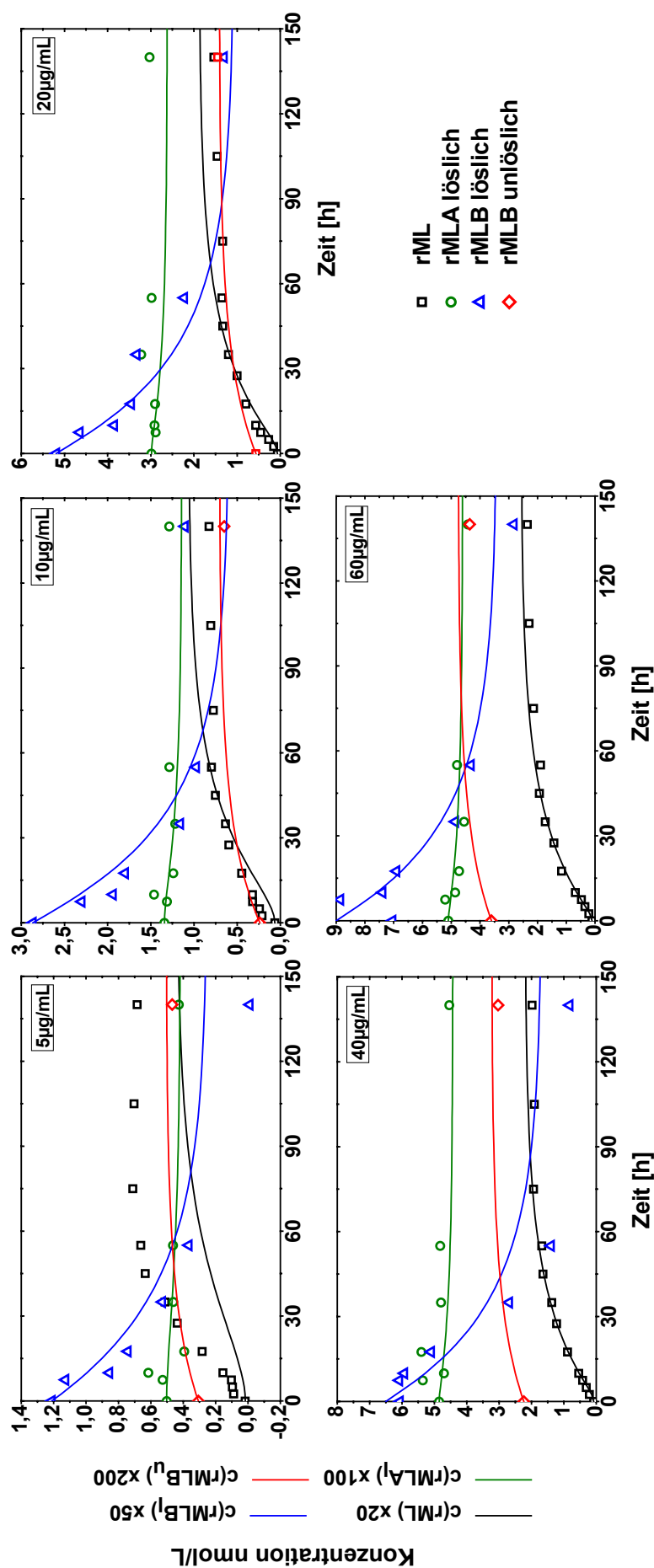


Abbildung 4.35: Anpassung eines Experimentes an das Modell M 6 (Datensatz 2)

Reaktionsordnung der rML-Bildung: 2. Ordnung; Bildung von B_x : n. Ordnung; alle anderen Reaktionen: 1. Ordnung. Symbole: gemessene Werte; Linien: mathematische Anpassung. Bei diesem Datensatz ergeben sich folgende Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten: $k_1 = 4,26 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 0,26 \%$; $k_2 = 6,26 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1} \pm 3,01 \%$ mit $n = 1 \pm 0,70 \%$; $k_3 = 1,99 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1} \pm 0,24 \%$; $k_5 = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \pm 0,59 \%$. Die angegebenen prozentualen Abweichungen entsprechen der Genauigkeit der Sensitivitätsanalyse. Diese ist eine mathematische Methode für die Bewertung der Ergebnisse einer Parameterschätzung. Sie untersucht das Verhältnis zwischen experimentellen Daten und mathematischen Modell und stellt ein Maß für die Sensitivität eines Parameters gegenüber kleinen Änderungen der Messwerte dar.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Optimierung der Rückfaltung zur Gewinnung von rekombinantem Mistellektin I durchgeführt. Der vorhandene Rückfaltungsprozess des in der klinischen Studie Phase I befindlichen rViscumins sollte verbessert werden.

Die Herstellung der rekombinanten MLA- und MLB-Ketten in *Escherichia coli* ergibt sich in der Form von inaktiven Inclusion Bodies, die aufgereinigt und solubilisiert worden sind.

Die Steigerung der Proteinlöslichkeit war ein Ziel dieser Arbeit, da abhängig von der eingesetzten Konzentration über die Hälfte der rMLA-Kette und bis zu 90 % der rMLB-Kette in den Rückfaltungspuffer ausfällt. Es steht daher nur ein relativ niedriger Monomeranteil zur Umsetzung in das korrekt gefaltete Dimer zur Verfügung. Bei Zunahme der Proteinkonzentration nimmt die Ausbeute aufgrund der Aggregationen ab.

Es wurden Bedingungen gesucht, um die Löslichkeit zu steigern und zudem einen höheren Umsatz zu erbringen. Um eine höhere Proteinlöslichkeit zu erreichen, wurden verschiedene Additive (wie z.B. Arginin) eingesetzt, mit denen zwar ein Großteil der Proteine in Lösung gebracht werden können, jedoch eine Bildung des rML unterdrückt wird.

Zu den wichtigsten Parametern, welche die Löslichkeit, Faltung und Kinetik eines Disulfid-verbrückten Proteins beeinflussen, zählen die Temperatur, das Redoxsystem und der pH-Wert.

Als optimale Temperatur wurde 7,5 °C bestimmt. Im Bereich von 2 – 10 °C ergeben sich ähnliche Umsätze. Niedrige Temperaturen erhöhen die Löslichkeit der Proteine, jedoch bedarf es einer bestimmten Temperatur, um die Energiebarrieren zur Faltung zu überwinden. Höhere Temperaturen führen zu erhöhter Aggregation und somit zu einer schlechteren Ausbeute.

Das Redoxsystem bzw. das Redoxpotential ist hier der ausschlaggebende Parameter. Es zeigt sich, dass nur kleine Abweichungen der Konzentrationen und Verhältnisse der reduzierenden und oxidierenden Agenzien im Rückfaltungssystem zu starken Veränderungen in der Produktbildung führen. Die Rückfaltung reagiert sehr empfindlich auf Anwesenheit von Sauerstoff, weshalb die Experimente unter relativ anaeroben Bedingungen durchgeführt wurden. Als produktivstes Redoxsystem wurde das kostengünstige Cystein/Cystin-Redoxsystem in einem Verhältnis 5:1 (6 mM) ausgewählt. Das Redoxpotential steigt während der Rückfaltung. Mit einer nachträglichen Zugabe von Redoxmitteln konnte je

nach Proteinzugabeart die Ausbeute, das heißt die Bildung von rML, um maximal das Doppelte gesteigert werden. Aufgrund der Empfindlichkeit der Renaturierung bezogen auf das Redoxsystem sind die Rückfaltungsverläufe bzw. Rückfaltungsgeschwindigkeiten in gleichen Experimenten unterschiedlich. Dies erschwert die mathematische Anpassung zur Erstellung eines Modells.

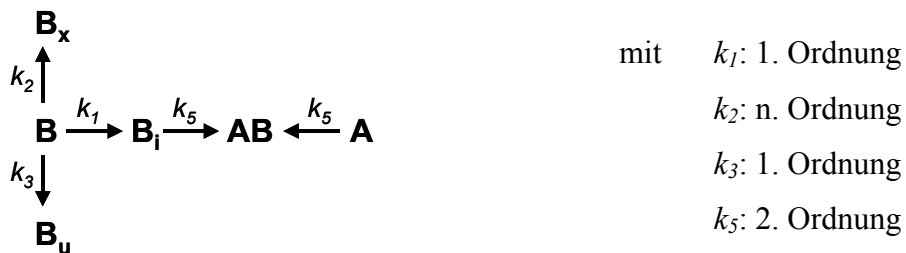
Der pH-Wert beeinflusst nicht nur die Löslichkeit und die Faltung der Proteine, sondern auch das Redoxpotential und die Stabilität der reduzierten Cysteine. Reduzierte Proteine bleiben bei niedrigeren pH-Werten erhalten, da unter diesen Bedingungen eine Disulfidbildung aufgrund der Protonen erschwert wird. Dieses wirkt sich auch auf das Redoxsystem aus. Daher sollten die pH-Bedingungen im Bereich der Stabilität des Proteins liegen. Isoelektrische Bedingungen sollten bei Rückfaltungsexperimenten vermieden werden [Jänicke and Rudolph, 1990]. Es wurde aufgrund einer besseren Pufferungseigenschaft der Rückfaltungspuffer II durch den Rückfaltungspuffer III ersetzt. Bei einem Redoxsystem Cystein/Cystin 5: 1 wurde ein optimaler pH-Wert von 7,5 ermittelt.

Die Proteinzugabeart ist ein weiterer wichtiger Aspekt in der rML-Renaturierung. Die Zugabe erfolgte über einen Verdünnungsschritt in einen Guanidin-haltigen Puffer (Rückfaltungsmethode B), da die direkte Zugabe der gelösten Inclusion Bodies-Proteine (Rückfaltungsmethode A) weniger effektiv ist. Bei gemeinsamer, pulsweiser Zugabe der Monomere in den Rückfaltungspuffer (Proteine werden jede Stunde über zehn Stunden zugegeben) kann im Gegensatz zu einer batchweisen und kontinuierlichen Zugabe die Ausbeute um bis zu 25 % gesteigert werden. Zudem ist die Löslichkeit der Proteine größer. Die rMLB-Kette, die aufgrund ihrer neun Cysteine mehrere Strukturen annimmt, bildet sich kontinuierlich über den Zeitraum von ca. 45 Stunden und liegt erst dann zum Hauptteil in dem reaktionsfähigen rMLB vor. Experimente mit 45 Stunden vorgelegtem rMLB zeigen eine schnellere Bildung von rML (10 – 20 Stunden) als bei einer gemeinsamen Zugabe, jedoch auch eine geringere Ausbeute aufgrund der niedrigen rMLB-Konzentration. Der Faltungsweg des rMLB bleibt unbekannt. Die Rückfaltung des rekombinanten Mistellektins I ist ein sehr langsamer und komplexer Prozess. Es wird zwar schon in den ersten Minuten rML gebildet, jedoch erreicht die Produktbildung erst nach ca. 100 Stunden ein Gleichgewicht.

Um die rMLB-Faltung zu vereinfachen, wurde ein von den zwei freien Cysteinen befreites Plasmid pT7 rMLB C21S-C194S in *Escherichia coli* transformiert und die daraus hergestellten Inclusion Bodies in der Rückfaltung eingesetzt. Diese Veränderung zeigt jedoch in Bezug auf die Produktbildung keine positiven Ergebnisse.

Die Rückfaltung der rMLA-Kette hingegen ist unkompliziert, sie trennt sich direkt nach Zugabe in unlösliches und hauptsächlich reaktionsfähiges, gelöstes rMLA. Es bildet sich aber schon im Verdünnungspuffer eine geringe Menge eines stabilen Homodimers rMLAA.

Der Rückfaltungsprozess des rML konnte infolge des Redoxpotentialeinflusses und des unbekannten Faltungsweges des rMLB nur in einem sehr vereinfachten Modell dargestellt werden:



Hierbei wurde ermittelt, dass sowohl die Reaktion von B zu B_i als auch die Assoziation der Monomere sehr langsame Prozesse sind (Stunden- bis Tagebereich), weshalb beide einen Einfluss auf die Rückfaltungsgeschwindigkeit nehmen. Die Rückfaltung des rMLB zeigt hierbei jedoch eine langsamere Reaktionsgeschwindigkeit auf, und ist damit im vereinfachten Modell der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter optimierten Bedingungen Produkt- ausbeuten bis zu 22,5 % (ca. 4,5 µg/mL) erreicht werden konnten, welches mindestens einer Verdopplung der Produktkonzentration im existierenden Prozess zur Herstellung von rViscumin (max. 2 µg/mL) bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 20 µg/mL entspricht. Es wird angenommen, dass bei einer weiteren Optimierung des Redoxsystems/-potentials, das heißt durch erneute Zugabe eines Redoxmittels bzw. Erhaltung der anaeroben Bedingungen, wesentlich höhere Ausbeuten und Rückfaltungsgeschwindigkeiten möglich sind. Dazu sollte ein sauerstofffreies System gewählt. Hier sollten weiterführende Arbeiten ansetzen.

Da die Renaturierung des rMLB einen großen Einfluss auf die Produktbildung und die Geschwindigkeit nimmt, wäre es ebenfalls interessant für das Verständnis und somit für eine Verbesserung des Prozesses den Faltungsweg des rMLB zu ergründen (z.B. mittels MALDI-TOF, NMR oder Fluoreszenzspektroskopie). So könnte letztendlich ein vollständiges Modell erstellt werden. Es würde sich anbieten Bedingungen zu schaffen, welche

die Rückfaltung des rMLB stabilisieren, womit sowohl die Aggregation verringert als auch eine schnellere Renaturierung erreicht werden könnte. Dazu könnte die rMLB-Zugabe bzw. -Vorlage weiter optimiert werden. Ein Einsatz von weiteren Additiven könnte die Rückfaltung ebenfalls unterstützen, wie z.B. Moleküle, mit denen das gefaltete rMLB wechselwirkt.

6. Literaturverzeichnis

- Abuharbeid, S.**, Apel, J., Sander, M., Fiedler, B., Langer, M., Zuzarte, M., Czubayko, F. and Aigner, A.; Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on HER-2 levels in SKOV-3 cells; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321, 403-412; 2004
- Agapov, I.I.**, Tonevitsky, A.G., Shamshiev, A.T., Pohl, E., Pohl, P., Palmer, R.A. and Kirpichnikov, M.P.; The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding; *FEBS Letters* 402, 91-93; 1997
- Agapov, I.I.**, Tonevitsky, A.G., Moysenovich, M.M., Maluchenko, N.V., Weyhenmeyer, R. and Kirpichnikov, M.P.; Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm; *FEBS Letters* 452, 211-214; 1999a
- Agapov, I.I.**, Tonevitsky, A.G., Maluchenko, N.V., Moisenovich, M.M., Bulah, Y.S. and Kirpichnikov, M.P.; Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport; *FEBS Letters* 464, 63-66; 1999b
- Allen, S.P.**, Polzzi, J.O., Gierse, J.K. and Easton, A.M.; Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*; *Journal of Bacteriology* 174, 6938-6947; 1992
- Anfinsen, C.B.** and Scheraga, H.A.; Experimental and theoretical aspects of protein folding; *Advances in Protein Chemistry* 29, 205-300; 1975
- Arakawa, T.** and Tiamsheff, S.N.; Stabilization of protein structure by sugars; *Biochemistry* 21, 6536-6544; 1982
- Armstrong, N.**, de Lencastre, A. and Gouaux, E.; carbonic anhydrase domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and a new protein folding screen: application to the ligand binding; *Protein Science* 8, 1475-1483; 1999
- Auster, F.** und Schäfer, J.; *Arzneipflanzen*; 21. Lieferung, Georg Thieme, Leipzig; 1960
- Baneyx, F.**; Recombinant protein expression in *Escherichia coli*; *Current Opinion in Biotechnology* 10, 411-421; 1999
- Bensadoun, A.** and Weinstein, D.; Assay of proteins in the presence of interfering materials; *Analytical Chemistry* 70, 241-250; 1976
- Beuth, J.**, Ko, H.L., Tunggal, L., Geisel, J. und Pulverer, G; Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galaktosid-spezifischem Mistlektin; *Arzneimittelforschung* 43, 166-169; 1993
- Blum, H.**, Beier, H. and Gross, H.J.; Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels; *Electrophoresis* 8, 93-99; 1987
- Bourot, S.**, Sire, O., Trautwetter, A., Touzé, T., Wu, L.F., Blanco, C. and Bernard, T.; Glycine betaine-assisted protein folding in a *lysA* mutant of *Escherichia coli*; *The Journal of Biological Chemistry* 275, 1050-1056; 2000

- Büssing, A.**, Regnery, A. and Schweizer, K.; Effects of *Viscum album* L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells *in vitro*: sister chromatid exchanges and activation / proliferation marker expression; Cancer Letters 94, 199-205; 1995
- Büssing, A.**, Suzart, K., Bergmann, J., Pfüller, U., Schietzel, M. and Schweizer, K.; Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins; Cancer Letters 99, 59-72; 1996
- Büssing, A.**; Mistletoe: a story with open end; Anti Cancer Drugs 8, 1; 1997
- Büssing, A.**, Vervecken, A.W., Wagner, M., Wagner, B., Pfüller, U. and Schietzel, M.; Expression of mitochondrial apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins; Cytometry 37, 133–139; 1999
- Bulaj, G.**; Formation of disulfide bonds in proteins and peptides; Biotechnology Advances 23, 87-92; 2005
- Caffisch, A.**; Protein folding: simple models for complex process; Structure, Previews 12, 1750-1752; 2004
- Chavez, L.L.**, Gosavi, S., Jennings, P.A. and Onuchic, J.N.; Multiple routes lead to the native state in the energy landscape of the beta-trefoil family; Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 103, 10254–10258; 2006
- Creighton, T.E.**; Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins; Protein Structure, Folding, and Design 249-257; 1986
- Creighton, T.E.**; Protein structure, a practical approach; IRL Press at Oxford University Press, England; Chapter 7; 1990
- Creighton, T.E.**; Protein folding coupled to disulphide bond; Biological Chemistry 378, 731-744; 1997
- De Bernardez Clark, E.**, Schwarz, E. and Rudolph, R.; Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding; Methods in Enzymology 309, 217-236, 1999
- De Bernardez Clark, E.**; Protein refolding for industrial processes; Current Opinion in Biotechnology 12, 22-207; 2001
- Dobson, C.M.**, Šali, A. and Karplus, M.; Protein folding: a perspective from theory and experiment; Angewandte Chemie (International ed in English) 37, 868 – 893; 1998
- Dobson, C.M.**; Protein misfolding, evolution and disease; Trends in Biochemical Sciences 24, 329-332; 1999
- Ebster, H.** und Jarisch, A.; Pharmakologische Untersuchungen über die Mistel. I. Mitteilung: Die Herzwirkung; Springer Berlin / Heidelberg, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 145, 297-311; 1929
- Ebster, H.**; Pharmakologische Untersuchungen über die Mistel. II. Mitteilung: Über die Wirkung auf den Kreislauf beim Kaninchen; Springer Berlin / Heidelberg, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 145, 312-320; 1929

- Eck, J.**, Langer, M., Möckel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H. and Lentzen, H.; Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain; *European Journal of Biochemistry* 264, 775-784; 1999a
- Eck, J.**, Langer, M., Möckel, B., Witthohn, K., Zinke, H. and Lentzen, H.; Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chain; *European Journal of Biochemistry* 265, 788-797; 1999b
- Elsässer-Beile, U.**, Voss, M., Schühle, R. and Wetterauer, U.; Biological effects of natural and recombinant mistletoe lectin and an aqueous mistletoe extract on human monocytes and lymphocytes *in vitro*; *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 14, 255-259; 2000
- Endo, Y.** and Tsurugi, K.; RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain; *The Journal of Biological Chemistry* 262, 8128-8130; 1987
- Endo, Y.**, Tsurugi, K. and Franz, H.; The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes; *FEBS Letters* 231, 378-380, 1988
- Ernst, E.**; Mistletoe for cancer?; Editorial Comment / *European Journal of Cancer* 37, 9-11; 2001
- Eschenburg, S.**, Kruspenhaar, R., Mikhailov, A., Stoeva, S., Betzel, C. and Voelter, W.; Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from *Viscum album*; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247, 367-372; 1998
- Estapé, D.** and Rinas, U.; Optimized procedures for purification and solubilization of basic fibroblast growth factor inclusion bodies; *Biotechnology Techniques* 10, 481-484; 1996
- Estapé, D.** and Rinas, U.; Folding kinetics of the all- β -sheet protein human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin-1 β ; *The Journal of Biological Chemistry* 274, 34083-34088; 1999
- Fahnert, B.**, Lilie, H. and Neubauer, P.; Inclusion bodies formation and utilization; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 89, 93-142; 2004
- Fink, A.L.**; Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid; *Folding & Design* 3, R9-R23; 1998
- Fischer, B.**, Sumner, I. and Goodenough, P.; Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies; *Biotechnology and Bioengineering* 41, 3-13; 1993
- Frantz, M.**, Jung, M.-L., Ribereau-Gayon, G. and Anton, R.; Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins; *Arzneimittelforschung* 50, 471-478; 2000
- Franz, H.**, Ziska, P. and Kindt, A.; Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.); *The Biochemical Journal* 195, 481-484; 1981
- Franz, H.**; Mistletoe lectins and their A and B chains; *Oncology* 43, 23-34; 1986
- Franz, H.**; 100 Jahre Lektinforschung – eine Bilanz; *Naturwissenschaften* 77, 103-109; 1990
- Fritz, P.**, Mürdter, T.E., Siegle, I., Aulitzky, W. und Voelter, W.; Therapie mit Mistel-extrakten in der Onkologie; *Onkologie* 7, 1247-1252; 2001

- Gabius, H.-J.** und Gabius, S.; Tumorlektinologie – Status und Perspektiven klinischer Anwendung; *Naturwissenschaften* 77, 505-514; 1990
- Gabius, S.** und Gabius, H.-J.; Lektinbezogene Mistelanwendung: Experimentelle Therapieform mit präklinisch belegtem Risikopotenzial; *Onkologie* 3, 254-259; 2004
- Gaius Plinius Secundus**; *Historia Naturalis*; 23-79 n. Chr.
- García-Fruitós, E.**, González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R.M., Arís, A., Ventura, S. and Villaverde, A.; Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins; *Microbial Cell Factories* 4, 27; 2005
- Gaultier, R.** and Chevalier, J.; Action physiologique du gui (*Viscum album*); *Comptes Rendues de l'Académie des Sciences de Paris* 145, 941-942; 1907
- Gazit, E.**; “Korrekt gefaltete” Proteine –ein metastabiler Zustand?; *Angewandte Chemie* 114, 267-269; 2002
- Georgiou, G.** and Valax, P.; Isolating inclusion bodies from bacteria; *Methods in Enzymology* 309, 48-58; 1999
- Gierasch, L.M.**, Lacy, J.E., Thompson, K.F., Rockwell, A.L. and Watnick, P.I.; Conformations of model peptides in membrane-mimetic environments; *Biophysical Journal* 37, 275-284; 1982
- Gloger, O.**; Stabilisierung von rekombinanten Mistellektin durch Gefriertrocknung, Dissertation, Christian-Alberts-Universität zu Kiel; 2002
- Gold, L.** and Stormo, G.D.; High-level translation initiation; *Methods in Enzymology* 185, 89-93; 1990
- Goldberg, M.E.**, Expert-Bezançon, N., Vuillard, L. and Rabilloud, T.; Non-detergent sulphobetaines: a new class of molecules that facilitate *in vitro* protein renaturation; *Folding & Design* 1, 21-27; 1995
- Goldstein, I.J.**, Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. and Sharon, N.; What should be called a lectin?; *Nature* 285, 66; 1980
- Goyert, A.**; Die Stellung der Mistel in der ganzheitlichen Krebstherapie; *Therapeutikon* 4, 24-31; 1990
- Gross, G.** and Hollatz, I.; Coliphage lambda t₀ terminator lowers the stability of messenger RNA in *Escherichia coli* hosts; *Gene* 72, 119-128; 1988
- Gültekin, H.** and Heermann, K.H.; The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix; *Analytical Biochemistry* 172, 320-29; 1988
- Habeck, M.**; Mistletoe compound enters clinical trials; *Drug Discovery Today* 8, 52-53; 2002
- Hagel, P.**, Gerding, J.J.T., Fieggen, W. and Bloemendal, H.; Cyanate formation in solutions of urea I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH; *Biochimica et Biophysica Acta* 243, 366-373; 1971

- Hajto, T.**, Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H.J.; Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract; *Cancer Research* 50, 3322-3326; 1990
- Halling, K.C.**, Halling, A.C., Murray, E.E., Ladin, B.F., Houston, L.L. and Weaver, R.F.; Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*; *Nucleic Acids Research* 13, 8019-8033; 1985
- Hanahan, D.**; Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580; 1983
- Hauser S.P.**; Mistel – Wunderkraut oder Medikament?; *Therapiewoche* 43, 76-81; 1993
- Heine, H.**; Mistelpräparate (*Viscum album* L.) Wirkungen auf menschliches Tumorgewebe *in vitro*; *Zeitschrift für Phytotherapie* 6, 67-72, 1985
- Hensel, H.**; Die Funktion des Fiebers im Krankheitsgeschehen; *Zeitschrift für Allgemeinmedizin* 57, 338-344; 1981
- Hincha, D.K.**, Pfüller, U. and Schmitt, J.M.; The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album* L.) leaves is correlated with leaf frost hardness; *Planta* 203, 140-144; 1997
- Jäggy, C.**, Musielski, H., Urech, K. and Schaller, G.; Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations; *Arzneimittelforschung* 45, 905-909; 1995
- Jänicke, R.** and Rudolph, R.; Protein structure, a practical approach; IRL Press at Oxford University Press, England; Chapter 9; 1990
- Jänicke, R.**; Protein folding: local structure, domains, subunits, and assemblies; *Biochemistry* 30, 3147-3161; 1991
- Jannsen, O.**, Scheffler, A. and Kabelitz, D.; *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins; *Arzneimittelforschung* 43, 1221-1227; 1993
- Jordan, E.** und Wagner, H.; Nachweis und quantitative Bestimmung von Lektin und Viscotoxinen in Mistelpräparaten; *Arzneimittelforschung* 36, 428-433; 1986
- Karplus, M.** and Weaver, D.L.; Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data; *Protein Science* 3, 650-668; 1994
- Katoh, S.** and Katoh, Y.; Continuous refolding of lysozyme with fed-batch addition of denatured protein solution; *Process Biochemistry* 35, 1119–1124; 2000
- Khan, R. H.**, Appa Rao, K.B.C., Eshwari, A.N.S., Totey, S.M. and Panda, A.K.; Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*; *Biotechnology Progress* 14, 722-728; 1998
- Kiefhaber, T.**, Rudolph, R., Kohler, H.-H. and Buchner, J.; Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation; *Bio/Technology* 9, 825-829; 1991
- Kienle, G.S.** und Kiene, H.; Klinische Studien zur Misteltherapie – Ein systematisches Review; 39. Stuttgarter Kongress für aktuelle Medizin der Bezirksärztekammer Nordwürttemberg, B28; 2004

- Kocourek, J.** and Hořejší, V.; Defining a lectin; *Nature* 290, 188; 1981
- Kopito, R.R.**; Biosynthesis and degradation of CFTR; *Physiological Reviews* 79, 167-173; 1999
- Kovacs, E.**; Effects of *Viscum album* extract therapy in patients with cancer: relation with interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130; *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 10, 241-246; 2004
- Krauspenhaar, R.**, Eschenburg, S., Perbandt, M., Kornilov, V., Konareva, N., Mikailova, I., Stoeva, S., Wacker, R., Maier, T., Singh, T., Mikhailov, A., Voelter, W. and Betzel, C.; Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257, 418-424; 1999
- Kyhse-Andersen, J.**; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10, 203-209; 1984
- Laemmli, U.K.**; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 227, 680-685; 1970
- Langer, M.**, Rothe, M., Eck, J., Möckel, B. and Zinke, H.; A nonradioactive assay for ribosome-inactivating proteins; *Analytical Biochemistry* 243, 150-153; 1996
- Lee, R.T.**, Gabius, H.-J. and Lee, Y.C.; Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin; *The Journal of Biological Chemistry* 267, 23722-23727; 1992
- Lentzen, H.**, Eck, J., Baur, A. and Zinke, H.; Rekombinantes Mistlektin; *Europäische Patentschrift* EP 0751221B1; 1998
- Lilie, H.**, Schwarz, E. and Rudolph, R.; Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*; *Current Opinion in Biotechnology* 9, 497-501; 1998
- Llorente, A.**, Rapak, A., Schmid, S.L., van Deurs, B. and Sandvig, K.; Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus; *The Journal of Cell Biology* 140, 553-563; 1998
- Lord, J.M.** and Roberts, L.M.; Toxin Entry: Retrograde Transport through the Secretory Pathway; *The Journal of Cell Biology* 140, 733-736; 1998
- Luther, P.**, Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D. and Uhlenbruck, G.; The lectin from *Viscum album* L. – isolation, characterisation, properties and structure; *The International Journal of Biochemistry* 11, 429-435; 1980
- Lutter, P.**, Meyer, H.E., Langer, M., Witthohn, K., Dormeyer, W., Sickmann, A. and Blüggel, M.; Investigation of charge variants of rViscumin by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry; *Electrophoresis* 22, 2888-2897; 2001
- Lyu S.Y.**, Park, S.M., Choung, B.Y. and Park, W.B.; Comparative study of Korean (*Viscum album* var. *coloratum*) and European mistletoe (*Viscum album*); *Archives of Pharmacal Research* 23, 592-598; 2000
- Maachupalli-Reddy, J.**, Kelley, B.D. and De Bernardez Clark, E.; Effect of inclusion body contaminants on the oxidative renaturation of hen egg white lysozyme; *Biotechnology Progress* 13, 144-150; 1997

- Majewski, R.A.** and Domach, M.M.; Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*; *Biotechnology and Bioengineering* 35, 732-738; 1990
- Mansel, L.**; *Management & Krankenhaus Zeitung für Führungskräfte im Gesundheitswesen; Engagement in Biotechnologie*; GIT-Verlag GmbH & Co. KG; 25. Jahrgang; ISSN 0176-053 X; 04/2006
- Mansfeld, J.**, Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R. and Eijssink, V.G.H.; Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond; *The Journal of Biological Chemistry* 272, 11152–11156; 1997
- Markossian, K.A.** and Kurganov, B.I.; Protein folding, misfolding and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggregates; *Biochemistry (Moskau)* 69, 971-984; 2004
- Matthiessen, P. F.** und Tröger, W.; Die Misteltherapie des Krebses. In *Kombinierte Tumorthherapie*. (Ed. H. Wrba), Hippokrates Verlag, Stuttgart 2. Auflage, 271-290, 1995
- Mengs, U.**, Clare, C.B. and Pooley, J.A.; Genotoxicity testing of an aqueous mistletoe extract *in vitro*; *Arzneimittelforschung* 47, 316-319; 1997
- Mengs, U.**, Göthel, D. and Leng-Peschlow, E.; Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research; *Anticancer Research* 22, 1399-1408; 2002
- Middelberg, A.P.J.**; Preparative protein refolding; *Trends in Biotechnology* 20, 437-443; 2002
- Mierendorf, R.C.**, Percy, C. and Young, R.A.; Gene isolation by screening λ gt11 libraries with antibodies; *Methods in Enzymology* 152, 458-469; 1987
- Mikeska, R.**, Wacker, R., Arni, R., Singh, T.P., Mikhailov, A., Gabdoulkhakov, A., Voelter, W. and Betzel, C.; Mistletoe lectin I in complex with galactose and lactose reveals distinct sugar-binding properties; *Acta Crystallographica Section F* 61, 17-25; 2005
- Miller, J.F.**; Bacterial transformation by electroporation; *Methods in Enzymology* 235, 375-385; 1994
- Mirelman, D.**, Galun, E., Sharon, N. and Lotan, R.; Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin; *Nature* 256, 414-416; 1975
- Misawa, S.** and Kumagai, I.; Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies; *Biopolymers (Peptide Science)* 51, 297-307; 1999
- Mogk, A.**, Mayer, M.P. und Deuerling, E.; Mechanismen der Proteinfaltung, Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential; *Biologie in unserer Zeit* 31, 182-192; 2001
- Moisenovich, M.M.**, Demina, I.A., Agapov, I.I., Chelnokova, O.V., Kozlovskaya, N.V., Bereiter-Hahn, J., Tonevitsky, A.G. and Shumakov, V.I.; Ricin and Viscumin bind to different sites of the cell membrane; *Doklady Biological Sciences* 383, 175-178; 2002
- Moisenovich, M.M.**, Aapov, I., Marx, U., Bereiter-Hahn, J. and Tonevitsky, A.; Intracellular transport of plant toxins Ricin and Viscumin from different plasma membrane sites; *Arzneimittelforschung* 53, 470-475; 2003

- Müller C.** and Rinas, U.; Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography; *Journal of Chromatography A* 855, 203-213; 1999
- Müller C.:** Verfahrenstechnische und kinetische Aspekte der Renaturierung des humanen Wachstumsfaktors aus Blutplättchen (PDGF) aus Einschlusskörpern rekombinanter *Escherichia coli*; Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; 1998
- Müthing, J.**, Meisen, I., Bulau, P., Langer, M., Witthon, K., Lenzen, H., Neumann, U. and Peter-Katalinić, J.; Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc residues; *Biochemistry* 43, 2996-3007; 2004
- Müthing, J.**, Meisen, I., Kniep, B., Haier, J., Senninger, N., Neumann, U., Langer, M., Witthon, K., Milosević, J. and Peter-Katalinić, J.; Tumor-associated CD75s gangliosides and CD75s-bearing glycoproteins with Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc residues are receptors for the anticancer drug rViscumin; *The FASEB Journal* 19, 103-105; 2005
- Neuhoff, V.**, Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W.; Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250; *Electrophoresis* 9, 255-262; 1988
- Niwa, H.**, Tonevitsky, A.G., Agapov, I.I., Sward, S., Pfüller, U. and Palmer, R.A.; Crystal structure at 3Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose; *European Journal of Biochemistry* 270, 2739-2749; 2003
- Nolle, J.;** *Phytopharmakologische Studien. Zur Pharmakologie der Mistel*; Springer Berlin/Heidelberg, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 158, 90-107; 1930
- Olsnes, S.**, Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A.; Isolation and characterization of Viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe); *The Journal of Biological Chemistry* 257, 13263-132; 1982
- Pelham, O.R.B.**, Roberts, L.M. and Lord, J.M.; Toxin entry: how reversible is the secretory pathway?; *Trends in Cell Biology* 2, 183-185; 1992
- Price, N.C.:** *The mechanisms of protein folding*; Pain, R.H.; Oxford University Press (New York), Chapter 7; 1994
- Rehm, H.;** *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, Gustav Fischer, 4. Auflage; ISBN 3-8274-1195-5; 2002
- Renner, M.**, Weber, P. und Hinz, H.-J.; Punktmutation und Proteinstabilität; *Journal of Thermal Analysis* 35, 639-657; 1989
- Ribéreau-Gyon, G.**, Jung, M.L. und Beck J.P. ; *Die Proteine, Alkaloide und Polysaccharide der Mistel (Viscum album L.)*; *Therapeutikon* 3, 22-26; 1989
- Rinas, U.** and Bailey, J.E.; Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*; *Applied Microbiology Biotechnology* 37, 609-614; 1992
- Rini, J.M.;** *Lectin structure*; *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 24, 551-77; 1995

- Rüdiger, H.;** Lectine, pflanzliche zuckerbindende Proteine; *Naturwissenschaften* 65, 239-244; 1978
- Rudolph, R.** and Lilie, H.; *In vitro* folding of inclusion body proteins; *The FASEB Journal* 10, 49-56; 1996
- Sánchez de Groot, N.** and Ventura, S.; Protein activity in bacterial inclusion bodies correlates with predicted aggregation rates; *Journal of Biotechnology* 125, 110-113; 2006
- Sandvig, K.** and van Deurs, B.; Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin; *Physiological Reviews* 76, 949-966; 1996
- Sandvig, K.** and van Deurs, B.; Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries; *FEBS Letters* 452, 76-70; 1999
- Sawers, G.** and Jarsch, M.; Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*; *Applied Microbiology Biotechnology* 46, 1-9; 1996
- Schaffrath, B.,** Mengs, U., Schwarz, T., Hilgers, R.D., Beuth, J., Möckel, B., Lentzen, H. and Gerstmayer, B.; Anticancer activity of rViscumin (recombinant mistletoe lectin) in tumor colonization models with immunocompetent mice; *Anticancer Research* 21, 3981-3988; 2001
- Schink, M.,** Moser, D. and Mechelke, F.; Two-dimensional isolectin patterns of the lectins from *Viscum album* L. (mistletoe); *Naturwissenschaften* 79, 80-81; 1992
- Schmidt, F.R.;** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry; *Applied Microbial Biotechnology* 65, 363-372; 2004
- Schöffski, P.,** Riggert, S., Fumoleau, P., Campone, M., Bolte, O., Marreaud, S., Lacombe, D., Baron, B., Herold, M., Zwierzina, H., Wilhelm-Ogunbiyi, K., Lentzen, H. and Twelves, C.; Phase I trial of intravenous aviscumin (rViscumin) in patients with solid tumours: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group; *Annals of Oncology* 15, 1816-1824; 2004
- Schöffski, P.,** Breidenbach, I., Krauter, J., Bolte, O., Stadler, M., Ganser, A., Wilhelm-Ogunbiyi, K. and Lentzen, H.; Weekly 24 h infusion of aviscumine (rViscumin): A phase I study in patients with solid tumours; *European Journal of Cancer* 41, 1431-1438; 2005
- Schubert, U.,** Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R.; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; *Nature* 404, 770-774; 2000
- Simpson, J.C.,** Roberts, L.M., Römisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. and Lord, J.M.; Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast; *FEBS Letters* 459, 80-84; 1999
- Singh, S.M.** and Panda, A.K.; Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins; *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 303-310; 2005
- Smith, P.K.,** Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Frovenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk D.C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Analytical Biochemistry* 19, 76-85; 1985

- Soler, M.H.**, Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T. and Voelter, W.; Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I; FEBS Letters 399, 153-157; 1996
- Soler, M.H.**, Stoeva, S. and Voelter, W.; Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I; Biochemical and Biophysical Research Communications 246; 596-601; 1998
- States, D.J.**, Dobson, C.M., Creighton, T.E. and Karplus, M.; A new two-disulphide intermediate in the refolding of reduced bovine pancreatic trypsin inhibitor; Journal of Molecular Biology 174, 411-418; 1984
- Stempfer, G.**, Höll-Neugebauer, B. and Rudolph, R.; Improved refolding of an immobilized fusion protein; Nature Biotechnology 14, 329-334; 1996
- Stettin, A.**, Schultze, J.L., Stechemesser, E. and Berg, P.A.; Anti-mistletoe lectin antibodies are produced in patients during therapy with an aqueous mistletoe extract derived from *Viscum album* L. and neutralize lectin-induced cytotoxicity *in vitro*; Klinische Wochenschrift 68, 986-1000; 1990
- Strudsholm, K.**, Nielsen, J. and Emborg, C.; Product formation during batch fermentation with recombinant *Escherichia coli* containing a runaway plasmid; Bioprocess Engineering 8, 173-181; 1992
- Studier, F.W.** and Moffatt, B.A.; Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes; Journal of Molecular Biology 189, 113-130; 1986
- Sweeney, E.C.**, Palmer, R.A. and Pfüller, U.; Crystallization of the ribosome inactivating protein ML1 from *Viscum Album* (mistletoe) complexed with β -D-galactose; Journal of Molecular Biology 234, 1279-1281; 1993
- Sweeney, E.C.**, Tonevitsky, A.G., Palmer, R.A., Niwa, H., Pfueller, U., Eck, J., Lentzen, H., Agapov, I.I. and Kirpichnikov, M.P.; Mistletoe lectin I forms a double trefoil structure; FEBS Letters 431, 367-370; 1998
- Tahirov, T.H.**, Lu, T.H., Liaw, Y.C., Chen, Y.L. and Lin, J.Y.; Crystal structure of Abrin-a at 2.14 Å; Journal of Molecular Biology 250, 345-367; 1995
- Taylor, G.**, Hoare, M., Gray, D.R. and Marston, F.A.O.; Size and density of protein inclusion bodies; Bio/Technology 4, 553-557; 1986
- Thornton, J.M.**; Disulphide Bridges in Globular Proteins, Journal of Molecular Biology 151, 261-287; 1981
- Tonevitsky, A.G.**, Agapov, I., Temiakov, D., Moisenovich, M., Maluchenko, N., Solopova, O., Würzner, G. and Pfüller, U.; Study of heterogeneity of lectins I mistletoe preparations by monoclonal antibodies to their A-subunits; Arzneimittelforschung 49, 970-975; 1999
- Tsumoto, K.**, Ejima, D., Kumagai, I. und Arakawa, T.; Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies; Protein Expression and Purification 28, 1-8; 2003
- Tsumoto, K.**, Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J.S. and Arakawa, T.; Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification; Biotechnology Progress 20, 1301-1308; 2004

- Urech, K.**; Mistelteinn 2001/2; Giftprozesse der Mistel – eine Polarität; Kooperative Dürnau, ISSN 1660-1173; 2001
- Vallejo, L.F.** and Rinas, U.; Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins; *Microbial Cell Factories* 3, 11; 2004a
- Vallejo, L.F.** and Rinas, U.; Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration; *Biotechnology and Bioengineering* 85, 601-609; 2004b
- Vallejo, L.F.**; Technical and kinetic aspects of the *in vitro* refolding process of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli* produced inclusion bodies; Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; 2006
- Varley, P.**, Christensen, H., Wingfield, P.T., Pain, R.H. and Clore, G.M.; Kinetics of folding of the all- β -sheet protein interleukin-1 β ; *Science* 260, 1110-1113; 1993
- VFA**, Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V., Autor unbenannt; Gentechnische Arzneimittel; Arzneimittelmarkt, Gentechnische Arzneimittel in der Anwendung, F&E Konkret 3, Broschüre; 2006
- Walsh, G.**; Biopharmaceutical Benchmarks-2003; *Nature Biotechnology* 21, 865-870; 2003
- Weber, K.**, Mengs, U., Schwarz, T., Hajto, T., Hostanska, K., Allen, T.R., Weyhenmeyer, R. and Lentzen, H.; Effects of a standardized mistletoe preparation on metastatic B16 melanoma colonization in murine lungs; *Azneimittelforschung* 48, 497-502; 1998
- Xie, Y.**, Lashuel, H.A., Miroy, G.J., Dikler, S. and Kelly, J.W.; Recombinant human retinol-binding protein refolding, native disulfide formation, and characterization; *Protein Expression and Purification* 14, 31-37; 1998
- Yancey, P.H.**, Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N.; Living with water stress: evolution of osmolyte systems; *Science* 217, 1214-1222; 1982
- Yoshii, H.**, Furuta, T., Yonehara, T., Ito, D., Linko, Y.-Y. and Linko, P.; Refolding of denatured/reduced lysozyme at high concentration with diafiltration; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 1159-1165; 2000
- Yoshimoto, M.**, Shimanouchi, T., Umakoshi, H. and Kuboi, R.; Immobilized liposome chromatography for refolding and purification of protein; *Journal of Chromatography B* 743, 93-99; 2000
- Zarkovic, N.**, Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M., Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S., Konitzer, M. and Mang, S.; An overview on anticancer activities of the *Viscum Album* Extract Isorel®; *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 16, 55-62; 2001
- Zettlmeissl, G.**, Rudolph, R. and Jänicke, R.; Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. I. Physical properties and kinetics of aggregation; *Biochemistry* 18, 5567-5571; 1979

7. Anhang

7.1 Materialien- und Geräteangaben

Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Aceton, p.A.	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., New Jersey, USA
Acetonitril	Methylcyanid CH_3CN	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., New Jersey, USA
Acrylamidlösung	30 % Acrylamid- und 0,8 % Bisacrylamidstammlösung im Verhältnis 37,5:1 Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agar	Bacto™ Agar	Difco™, BD (Becton, Dickinson and Company), New Jersey, USA
Ammoniaklösung	NH_3 in H_2O	Merck KGaA, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	NH_4HCO_3	Merck KGaA, Deutschland
di-Ammoniumhydrogenphosphat	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Merck KGaA, Deutschland
APS	Ammoniumpersulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Amersham, GE Healthcare, Großbritannien
Ampicillin	D[-]- α -Aminobenzylpenicillin- Natriumsalz $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{SNa}$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Antikörper gegen Mistellektinketten	<p>TA5 30301TA5G11: 0,8 mg/mL; WB: 1:3000 ; ELLA: 1 :1500 030303: 1,8 mg/mL; WB: 1:15000; ELLA: 1:1500</p> <p>TB33 BRAIN: 2.2 mg/mL; 1:15000 2.3.1 B 280498:1,1 mg/mL; 1:1000</p> <p>36-2-0 mAK 10/02-01: 0,8 mg/mL; 1:160</p> <p>TA5b (biotinylierter TA5) 030326: 2 mg/mL; 1:660 030326b: 2 mg/mL; 1:440</p>	Viscum AG, Deutschland
Antikörper	<p>(Anti-Maus IgG)-IgG aus Ziege, A3562</p> <p>Streptavidin-Peroxidase aus <i>Streptomyces avidinii</i>, S5512</p> <p>Anti-Maus-IgG-Peroxidase aus Ziege, A4416</p>	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
L-Arginin	<p>(+)-2-Amino-5-guanidino- pentanosäure $C_6H_{14}N_4O_2$</p>	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Asialofetuin	Asialofetuin von fötalem Kälberserum, Typ I	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
BCA-Assay	BCA Protein Assay Reagent Kit, 23225	Pierce Biotechnology, Inc., Illinois, USA
Borsäure	H_3BO_3	Merck KGaA, Deutschland
BSA	Bovine Serum Albumin	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland, seit 1997 Roche Boehringer Mannheim Diagnostics, Schweiz

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate	-	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoly- phosphat p-Toluidinsalz $C_8H_6BrClNO_4P \cdot C_7H_9N$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Bromphenolblau	3',3'',5',5''-Tetrabromphenol- sulfon-phtalein-Natriumsalz $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$	Merck KGaA, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	$HOC(COOH)(CH_2COOH)_2 \cdot H_2O$, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Merck KGaA, Deutschland
Coomassie	Coomassie®-Brilliantblau R 250	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethan- sulfonsäure	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Cystein	<i>L</i> -Cysteinmonochlorid- monohydrat $C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$	Merck KGaA, Deutschland
Cystin	<i>L</i> -Cystin-dichlorid $C_6H_{12}N_2O_4S_2 \cdot 2 HCl$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Deoxycholat	3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β - cholamsäure-Natriumsalz $C_{24}H_{39}NaO_4$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Dimethylformamid	N,N-Dimethylformamid C_3H_7NO	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DTT	<i>DL</i> -Dithiothreitol $C_4H_{10}O_2S_2$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure-di-Natrium- Dihydrat $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot H_2O$	Riedel-de-Haën, Deutschland, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Essigsäure (100 %)	CH_3CO_2H	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Ethanol	C_2H_5OH	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., New Jersey, USA
Fe(III)Citrat	Eisen (III)-Citrat-Hydrat (Fe 19 %) $FeC_5H_5O_7 \cdot H_2O$	Merck KGaA, Deutschland
Formaldehydlösung (37 %)	HCHO	Merck KGaA, Deutschland
Gentamicinsulfat	Aminoglycosid-Antibiotikum $C_{19-21}H_{39-43}N_5O_7 \cdot 2,5 H_2SO_4$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Glukose-Monohydrat	<i>D</i> (+)Glucose-Monohydrat $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	Merck KGaA, Deutschland
GSSG	Glutathion oxidiert $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
GSH	Glutathion reduziert $C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Glycerin	1,2,3-Propanetriol $C_3H_8O_3$	Merck KGaA, Deutschland
Glycin	Aminoessigsäure $C_2H_5NO_2$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Guanidin-Monochlorid (Gnd-HCl)	Aminomethanamidin $CH_5N_3 \cdot HCl$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Hefeextrakt	Bacto™ Yeast Extract	Difco™, BD (Becton, Dickinson and Company), New Jersey, USA
Iodacetat	Iodacetat-Natriumsalz $C_2H_2INaO_2$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
IPTG	Isopropyl β -D-1- thiogalactopyranosid $C_9H_{18}SO_5$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Kaliumchlorid	KCl	Riedel-de-Haën, Deutschland, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Deutschland
K ₂ H ₂ EDTA • 2 H ₂ O	Ethylendiamin-N,N,N',N'- tetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat C ₁₀ H ₁₄ N ₂ K ₂ O ₈ • 2 H ₂ O	Riedel-de-Haën, Deutschland, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kobald(II)-chlorid-Hexahydrat	CoCl ₂ • 6 H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	CuCl ₂ • 2 H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
Laktose	D(+)Lactose-Monohydrat C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ • H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
Low-Molecular-Weight- Marker	Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa)	New England BioLabs GmbH, Massachusetts, USA
Magermilchpulver	Skim milk, low fat milk	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Magnesiumchlorid-6-hydrat	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	Riedel-de-Haën, Deutschland, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
Maleinimid	2,5-Pyrroledion C ₄ H ₃ NO ₂	Merck KGaA, Deutschland
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	MnCl ₂ • 4 H ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
MES	2-[N-Morpholino]- ethansulfonsäure C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Methanol	CH ₃ OH	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., New Jersey, USA

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Milli-Q-Wasser	Water Purification System < 0,066 µS/cm	Millipore Corp., Massachusetts, USA
Natriumbenzoat	Benzoessäure Natriumsalz $C_6H_5CO_2Na$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, USA
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	$NaCl$	Merck KGaA, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., New Jersey, USA
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Riedel-de-Haën, Deutschland, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydroxid	$NaOH$	Merck KGaA, Deutschland
<i>di</i> -Natriummolybdat-Dihydrat	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck KGaA, Deutschland
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NA	Nicotinsäure $C_6H_5NO_2$	Merck KGaA, Deutschland
Nitrotetrazoliumchloridblau	2,2'-Di-p-nitrophenyl-5,5'- diphenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy- 4,4'-diphenylen]- ditetra- zoliumchlorid $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
85 % Phosphorsäure	<i>ortho</i> -Phosphorsäure H_3PO_4	Merck KGaA, Deutschland
Prestained Marker	Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa)	New England BioLabs GmbH, Massachusetts, USA

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
PPS	3-(1-Pyridino)-1-Propansulfonat $C_8H_{11}NO_3S$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PSA	Pyridin-3-sulfonsäure $C_5H_5NO_3S$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SDS	Natrium-Dodecylsulfat $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
32 % Salzsäure	HCl	Merck KGaA, Deutschland
Silbernitrat	$AgNO_3$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Schwefelsäure	H_2SO_4	Riedel-de-Haën, Deutschland, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin $C_6H_{10}N_2$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
TMB	TMB-One-Ready-to-Use- Substrat 3,3',5,5''-Tetramethylbenzidin [$-C_6H_2(CH_3)_2-4-NH_2$] ₂	Kem En Tec Diagnostics, A/S, Dänemark
TCA	Trichloressigsäure $C_2HCl_3O_2$	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris, Trisma [®] Base	Tris(hydroxymethyl)amino- methan $NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Triton X-100	Polyethylen-glycol-tert- octylphenylether t-Oct- $C_6H_4(OCH_2CH_2)_xOH$ x: 9 – 10	Fluka AG, Schweiz, gehört zu Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Fortsetzung: Tabelle 7.1: Chemikalien

Chemikalie / Abkürzung	Name / IUPAC / Summenformel	Hersteller
Trypsin	Trypsin (sequencing grade modified)	Promega Corporation, Wisconsin, USA
Trypton	Bacto™ Trypton (pancreatic digest of casein)	Difco™, BD (Becton, Dickinson and Company), New Jersey, USA
Tween® 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat	Merck KGaA, Deutschland
Zinkacetat-Dihydrat	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Deutschland

Tabelle 7.2: Geräte, Materialien und Software

Gerät	Typ	Firma
Bioreaktor	Glasreaktor	Giovanola Frères, Schweiz
Blotting-Kammer	Trans-Blot®SD, Semi-Dry Transfer cell	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Blotting-Membran	Immobilon™-P Transfer Membran PVDF	Millipore Corp., Massachusetts, USA
Blotting-Filterpapier	GB003 Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell GmbH, Deutschland, seit 2004 Whatman plc, Großbritannien
Brutschrank	HT® 4	Infors AG, Schweiz
Elektroporationsapparat	E. coli Pulser™ Transformation Apparat	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Elektroporationsküvetten	GenePulser® Cuvette	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
flexAnalysis 2.0	-	Bruker Daltonics GmbH, Deutschland
Gele	8 – 16 %-ige und 4 – 20 %-ige Tris-HCl Criterion™ Precast Gele (1 mm, 26 Comb, 15 µL)	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA

Fortsetzung: Tabelle 7.2: Geräte, Materialien und Software

Gerät	Typ	Firma
Gelelektrophoresekammer	Criterion™ Cell, Mini Protean	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Geltrocknungsfolien	GelAir Cellophane Support	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Glukoseanalysator	YSI Biochemischer Analysator 2700 Select Biochemistry Analyser	Kreienbaum wissenschaftliche Messsysteme e.K., Deutschland
Kryostat	F25	JULABO Labortechnik GmbH, Deutschland
Küvetten	Plastibrand® PMMA, 1,5 mL halbmikro	Brand GmnH & Co. KG, Deutschland
Inkubationsschrank (ELISA)	B 6030	Heraeus GmbH, Deutschland
MASCOT 2.1.0	-	Matrix Science Ltd., Großbritannien
Massenspektrometer, MALDI-TOF	Ultraflex TOF/TOF	Bruker Daltonics GmbH, Deutschland
MATLAB® Version 5.3	-	The MathWorks Inc., Massachusetts, USA
Mikrotiterplatten (96-Well) für ELISA / ELLA	Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface	Nalge Nunc International, Dänemark
Mikrotiterplattenreader	MD Spectra Max 190 Microtiter-Reader	Molecular Devices Corp., USA
Mikrotiterplattenwascher	Columbus Microtiterplatten Wascher	Tecan trading AG, Schweiz
Photometer	Novaspec® II	Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Großbritannien
Pumpe	Peristaltic Pump P-1	Pharmacia Fine Chemicals, GE Healthcare, Großbritannien
QuantiScan Version 2.1	-	BIOSOFT®, Großbritannien
Redoxelektrode	Pt 42 A	SCHOTT Instruments, Deutschland

Fortsetzung: Tabelle 7.2: Geräte, Materialien und Software

Gerät	Typ	Firma
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL-Reaktionsgefäße	eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL oder 2 mL	Eppendorf AG, Deutschland
Reaktoren im Sixfors-System	350 mL, PS 98, NM 65	Schmizo AG, Schweiz
Sixfors-System	Sixfors	Infors AG, Schweiz
Schüttler	Eb Swip KI-2	Edmund Bühler GmbH, Deutschland
SOFTmax [®] PRO Version 3.1.2	-	Molecular Devices Corp., USA
Spannungsquelle	Model 200 / 2.0 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Temperaturelektrode	Pt-100	Infors AG, Schweiz
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Deutschland
Trockenschrank	Vacutherm	Heraeus GmbH, Deutschland
Ultrafiltrationseinheiten	Vivaspin [®] (Membran: Polyethersulfon (PES), regenerierte Cellulose (RC), Cellulose Triacetat (CTA) Volumina (0,5 – 6 mL), Membranporengrößen (5000 – 30000 MWCO)) Ultrafree [®] (Biomax Membran (PES), 10000 MWCO, 0,5 mL), Amicon [®] Ultra-4 (RC, 10000 MWCO, 4 mL)	Vivascience, Großbritannien Millipore Corp., Massachusetts, USA
Ultraschallgerät	Labsonic U	B. Braun Biotech International GmbH, Deutschland
Waage	BP 8100	Sartorius AG, Deutschland
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge 28 RS Multifuge 3S-R	Heraeus GmbH, Deutschland
Zip Tip _{C18} TM	-	Millipore Corp., Massachusetts, USA

Tabelle 7.3: Biomaterialien

Mikroorganismen / Vektorsysteme	Stamm / Name	Firma
<i>Escherichia coli</i>	BL21 DE3	Novagen [®] , Merck KGaA, Deutschland
Expressionsplasmid	pT7 rMLB C21S-C194S	Viscum AG, Deutschland

7.2 Sequenz von IbpA

Folgende Massen sind im MALDI-TOF ermittelt worden (siehe auch Abb. 7.1, S. 130), die nach Abgleich mit der NCBI-BLAST2-Protein-Datenbank zu den dargestellten Aminosäuresequenzen zugeordnet wurden. Dabei handelt es sich um wahrscheinliche, aber keine exakten Zuordnungen.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 11	1411.7252	1410.7179	1410.7078	7	1	-.MRNFDLSPLYR.S
1 - 11	1427.7166	1426.7093	1426.7027	5	1	-.MRNFDLSPLYR.S (Oxidation)
3 - 11	1124.5732	1123.5659	1123.5662	0	0	RNFDLSPLYRS
84 - 93	1213.6307	1212.6234	1212.6139	8	0	RTYLYQGIAERN
84 - 97	1759.8868	1758.8795	1758.8689	6	1	RTYLYQGIAERNFERK
98 - 108	1354.7711	1353.7638	1353.7517	9	1	RKFQLAENIHVRG
99 - 108	1226.6736	1225.6663	1225.6567	8	0	KFQLAENIHVRG
109 - 123	1659.9001	1658.8928	1658.8991	-4	0	RGANLVNGLLYIDLERV

Start-End: Position des Peptids im identifizierten Protein

Observed: gemessene Masse im Spektrum (entspricht der wirklichen Masse des Peptids addiert mit der Masse eines H⁺-Protons; spezifisch für die Methode der Ionisation in der MALDI-Konfiguration)

Mr(expt): Masse des Peptids ohne H⁺-Proton

Mr(calc): Theoretische Masse des verfügbaren Peptids aufgrund eines Vergleichs mit der NCBI-Datenbank

ppm: Teile pro Million; Massentoleranz

Miss: entspricht Schnittfehlern durch das Trypsin (ein Schnittfehler wird toleriert)

Sequence: die Sequenz des Peptids, die der beobachteten Masse entspricht

Die folgenden Massen konnten nicht zugeordnet werden:

1092.5461, 1109.4835, 1170.6298, 1229.7848, 1374.2453, 1379.6978, 1469.7772, 1475.7521, 1494.7271, 1526.7299, 1638.8394, 3548.5062

Werden diese Sequenzen wiederum mit der NCIB-Datenbank (NCBI Nr. 20070518 (4927571 Sequenzen; 1702359384 Reste)) verglichen, so wird IbpA von *Escherichia coli* ermittelt (Top Score: 118 für gi|15804286, heat shock protein (*Escherichia coli* O157:H7 EDL933)).

Die Sequenz ist hier dargestellt (übereinstimmende Sequenzen sind rot markiert):

1 MRNFDLSPLY RSAIGFDRLF NHLENNQSQS NGGYPPYNVE LVDENHYRIA
51 IAVAGFAESE LEITAQDNLL VVKGAHADEQ KERTYLYQGI AERNFERKFQ
101 LAENIHVRGA NLVNGLLYID LERVIPeAKK PRRIeIN

Die Sequenzen sind denen von vielen anderen Organismen ähnlich (kleine Hitzeschockproteine von z.B.: *Salmonella enterica*, *Serratia proteamaculans*, *Enterobacter*, *Yersinia pestis*). Das deutet auf eine hoch konservierte Gensequenz hin.

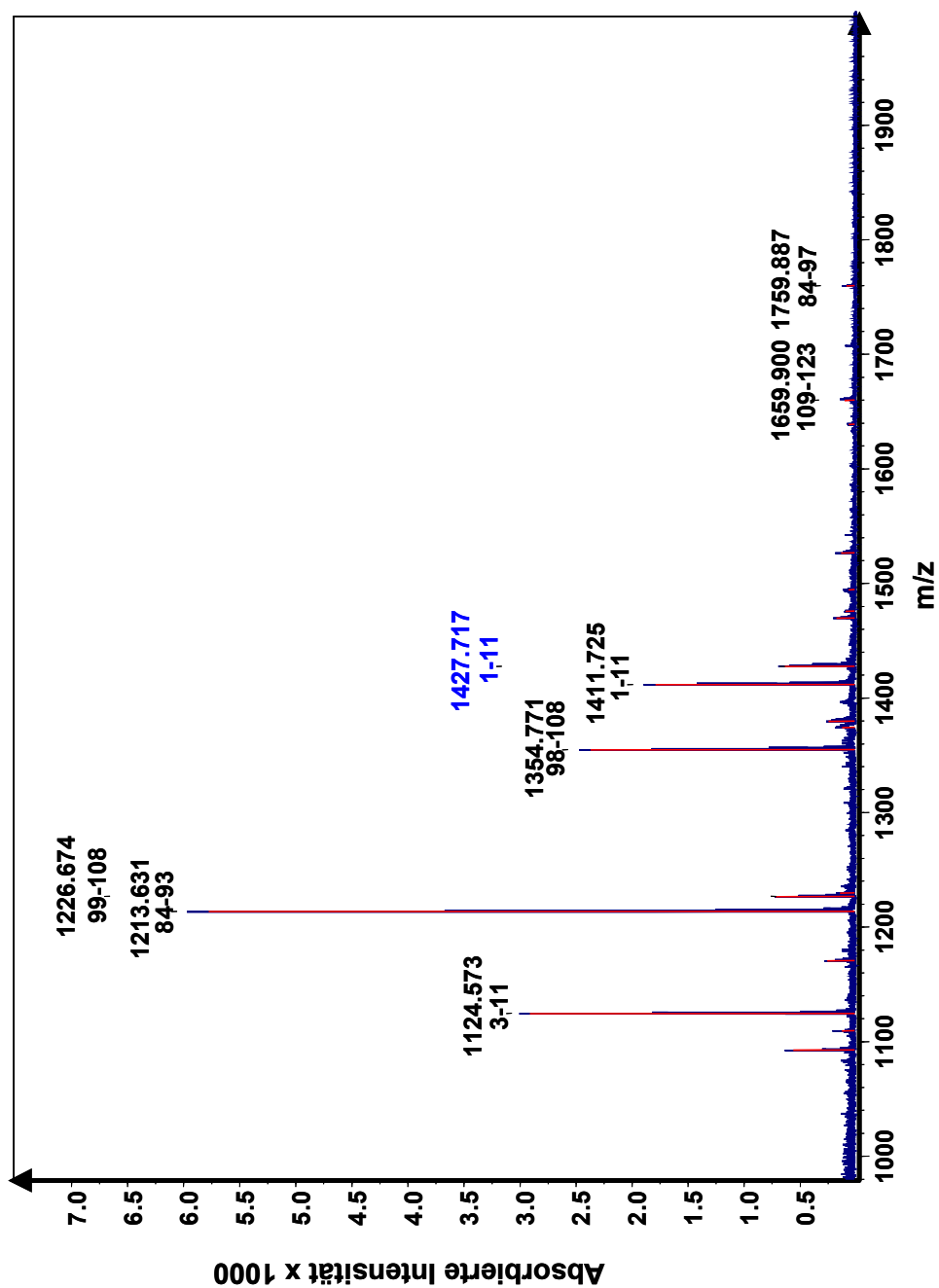


Abbildung 7.1: Massenspektrum (MALDI-TOF) mit identifizierten Massen

Identifizierte Daten sind mit der Masse und der Position im Protein markiert; m/z: Verhältnis Masse zu Ladung

7.3 Modellanpassungen zu Kapitel 4.4

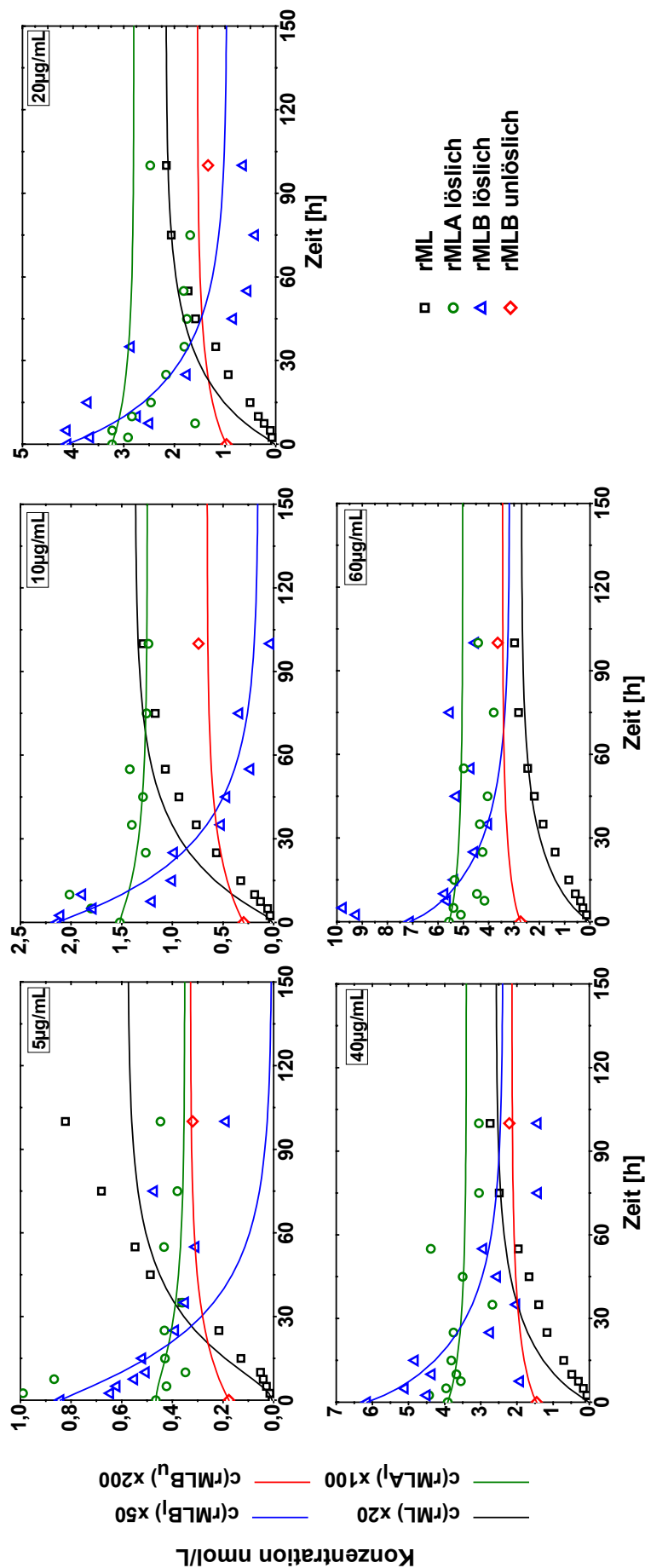


Abbildung 7.2: Anpassung eines Experimentes an das Modell M 6; Datensatz 4

Reaktionsordnung der rML-Bildung: 2. Ordnung; Bildung von B_x: n. Ordnung; alle anderen Reaktionen: 1. Ordnung. Symbole: gemessene Werte; Linien: mathematische Anpassung. Bei diesem Datensatz ergeben sich folgende Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten: $k_1 = 1,05 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1} \pm 0,13 \%$; $k_2 = 1,16 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1} \pm 5,05 \%$, $n = 3,45 \pm 0,28 \%$; $k_3 = 2,80 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1} \pm 0,12 \%$; $k_5 = 4,94 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \pm 0,68 \%$. Die angegebenen prozentualen Abweichungen entsprechen der Genauigkeit der Sensitivitätsanalyse (siehe Abb. 4.35, S. 102)

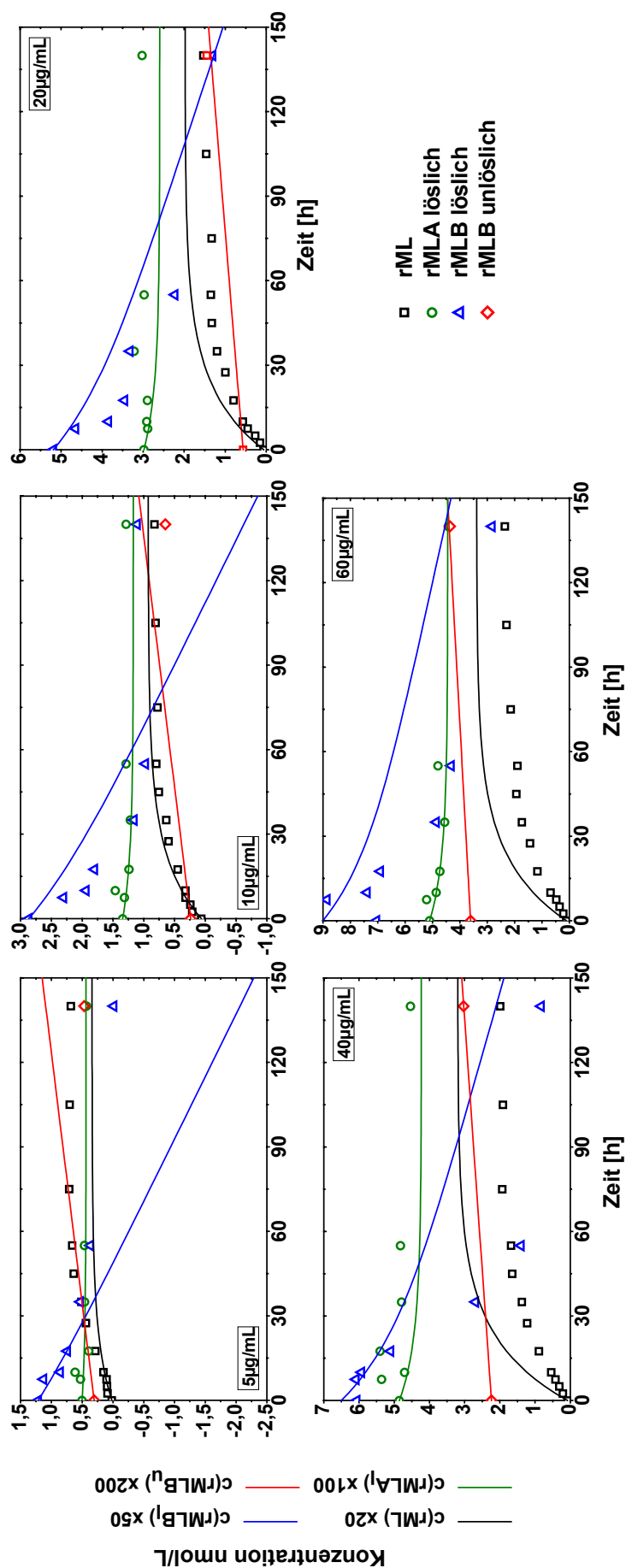


Abbildung 7.3: Anpassung eines Experimentes an das Modell M 2; Datensatz 2

Reaktionsordnung der rML-Bildung: 2. Ordnung; Bildung von B_i: 0. Ordnung; alle anderen Reaktionen: 1. Ordnung. Symbole: gemessene Werte; Linien: mathematische Anpassung. Bei diesem Datensatz ergeben sich folgende Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten: $k_1 = 1000 \text{ h}^{-1}$; $k_2 = 9,39 \text{ h}^{-1}$; $k_3 = 1,06 \cdot 10^{-1} \text{ h}^{-1}$; $k_4 = 4,04 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$; $k_5 = 5,68 \cdot 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Für diese Anpassung ließ sich keine Sensitivitätsanalyse durchführen.

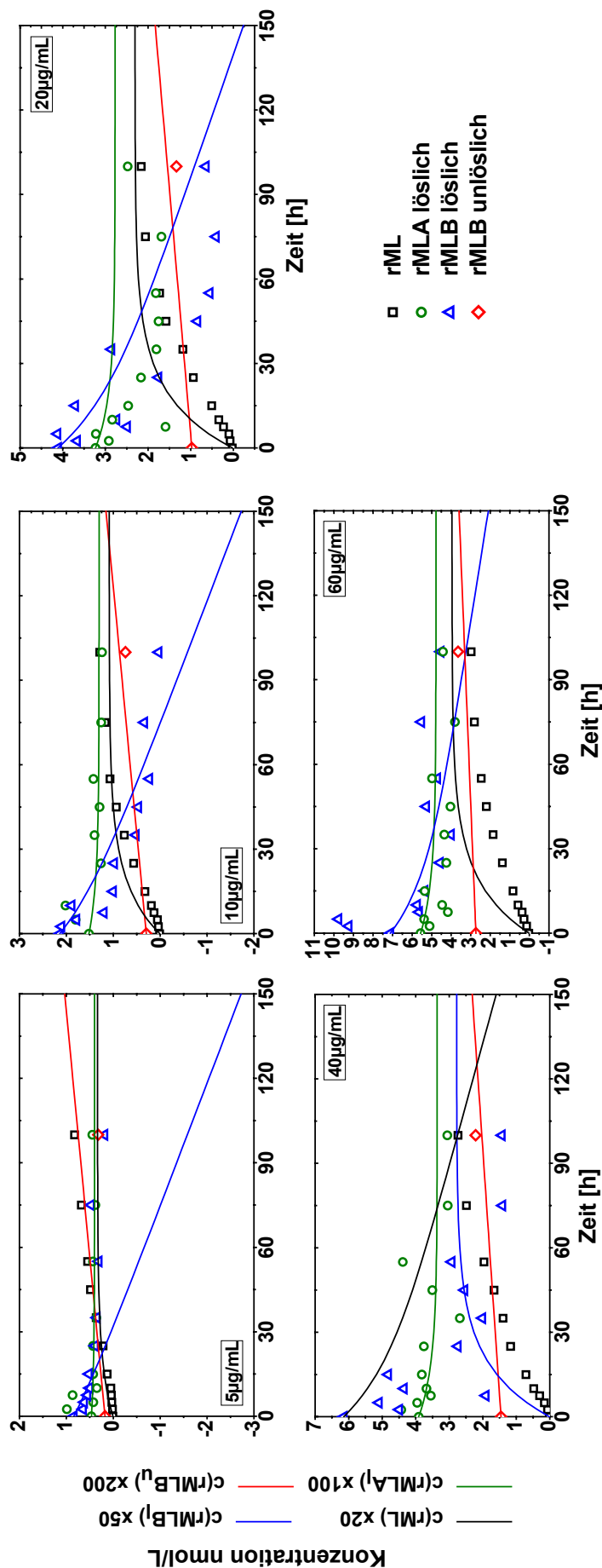


Abbildung 7.4: Anpassung eines Experimentes an das Modell M 2; Datensatz 4

Reaktionsordnung der rML-Bildung: 2. Ordnung; Bildung von B₁: 0. Ordnung; alle anderen Reaktionen: 1. Ordnung. Symbole: gemessene Werte; Linien: mathematische Anpassung. Bei diesem Datensatz ergeben sich folgende Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten: $k_1 = 1000 \text{ h}^{-1}$; $k_2 = 83,90 \text{ h}^{-1}$; $k_3 = 9,62 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$; $k_4 = 4,79 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$; $k_5 = 6,63 \cdot 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{nmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Für diese Anpassung ließ sich keine Sensitivitätsanalyse durchführen.